



F1000091075B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT**

91075

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 05 1994
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07K 7/20

SUOMI-FINLAND**(FI)**

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	883388
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	15.07.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	15.07.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	18.01.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
17.07.87 US 074126 P	

(71) Hakija - Sökande

1. ASTA Medica Aktiengesellschaft, Weismüllerstrasse 45, 6000 Frankfurt am Main 1, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Schally, Andrew V., 5025 Kawanee Avenue, Metairie, La. 70002, USA, (US)
2. Bajusz, Sandor, 10501 Curran Boulevard No 5W, New Orleans, La. 70127, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

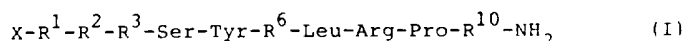
Menetelmä uusien terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av nya terapeutiskt användbara peptider

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 840909 (C 07K 7/20), EP B 81877 (C 07K 7/20),
Z. Naturforsch. 42b (1987) 101-106

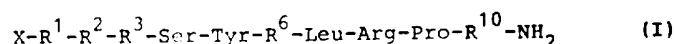
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uusien kaavan I mukaisten peptidien ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditionsuolojen valmistusta,



jossa kaavassa X on asyyliryhmä, joka on johdettu suoraketjuisesta tai haarautuneesta, alifaattisesta tai alisykklisestä karboksyylihaposta, jossa on 1 - 7 hiiliatomia; tai karbamoyylierhmä, R¹ on D- tai L-Pro, D- tai L-Δ³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-Hl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) tai D-Nal(2), R² on D-Phe tai D-Phe(4-Hl), R³ D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) tai D-Nal(2), R⁶ on D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) tai D-Hci(Q) ja R¹⁰ on Gly tai D-Ala, jolloin Hl on fluori, kloori tai bromi ja Q on C₁₋₃-alkyyli. Nämmä yhdisteet ovat LHRH-antagonisteja.

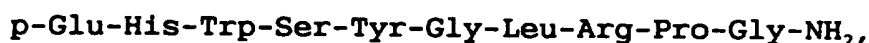
Uppfinningen avser framställning av nya peptider med formeln I och farmaceutiskt godtagbara syraadditionssalter därav,



i vilken formel X är en acylgrupp, som är härledd från en rakkedjad eller förgrenad, alifatisk eller alicyklisk karboxylsyra med 1 - 7 kolatomer; eller en karbamoylgrupp, R¹ är D- eller L-Pro, D- eller L-Δ³-Pro, D-Phe, D-Phe(4-Hl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) eller D-Nal(2), R² är D-Phe eller D-Phe(4-Hl), R³ är D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) eller D-Nal(2), R⁶ är D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) eller D-Hci(Q) och R¹⁰ är Gly eller D-Ala, varvid Hl är fluor, klor eller brom och Q är C₁₋₃-alkyl. Dessa föreningar är LHRH-antagonister.

Menetelmä uusien terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää uusien peptidien valmistamiseksi, jotka estävät nisäkkäillä gonadotropiini-
nien vapauttamista aivolisäkerauhasesta aiheuttamatta
kuitenkaan turvotusvastavaikutuksia. Erityisesti tämä
keksintö koskee menetelmää luteinisoivaa hormonia vapaut-
tavan hormonin (LHRH), jolla on kaava



analogien ja niiden suolojen valmistamiseksi.

Yli 15 vuoden ajan ovat tutkijat etsineet selek-
tiivisesti tehokkaita LHRH-dekapeptidin antagonisteja [M.
Karten ja J.E. Rivier, Endocrine Reviews, 7, 44 - 66
(1986)]. Suuri kiinnostus sellaisia antagonisteja kohtaan
perustuu niiden hyödyllisyyteen endokrinologian, gyneko-
logian, raskauden ehkäisyyn ja syövän alalla. On valmis-
tettu suuri määrä yhdisteitä potentiaalisina LHRH:n anta-
gonisteina. Kiinnostavimpia tähän mennessä löydettyjä an-
tagonisteja ovat ne yhdisteet, joiden rakenne edustaa
LHRH-rakenteen muunnelmia.

Ensimmäinen sarja tehokkaita antagonisteja saatiin
sijoittamalla aromaattisia aminohappojäännöksiä asemiin
1, 2, 3 ja 6 tai 2, 3 ja 6. Yhdisteet kuvataan LHRH:na,
jossa alkuperäisten aminohappojäännösten korvaaminen
muilla on ilmaistu yläindeksien avulla. Tunnettuja anta-
gonisteja ovat:

[Ac-D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp^{3,6}]LHRH (D.H. Coy et al.,
julkaisussa: Gross, E. ja Meienhofer, J. (toimittajat),
Peptides, Proceedings of the 6th American Peptid Sympo-
sium, s. 775 - 779, Pierce Chem. Co., Rockville, Il.,
1979);

[Ac-Pro¹, D-Phe(4-Cl)², D-Nal(2)^{3,6}]LHRH (US-pa-
tentti no. 4 419 347) ja

[Ac-Δ³-Pro¹, D-Phe(4-Cl)², D-Trp^{3,6}]LHRH (J.L. Pi-
neda et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 420, 1983).

Antagonistien vesiliukoisuuden lisäämiseksi sijoitettiin myöhemmin emäksisiä aminohappoja, kuten esimerkiksi D-Arg, 6-asemaan. Esimerkiksi [Ac-D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰]LHRH (ORG-30276) (D.H. Coy et al.,
5 Endocrinology, 100, 1 445, 1982); ja

[Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶]LHRH (ORF 18260) (J.E. Rivier et al., julkaisussa: Vickery B.H., Nestor, Jr. J.J., Hafez, E.S.E. (toimittajat), LHRH and Its Analogs, s. 11 - 22, MTP Press, Lancaster, UK,
10 1984).

Analogit eivät osoittaneet ainoastaan odotettua parantunutta vesiliukoisuutta, vaan niillä ilmeni myös parantunut antagonistinen vaikutus. Nämä erittäin tehokkaat, hydrofiiliset analogit, joissa on D-Arg ja muita
15 emäksisiä sivuketjuja 6-asemassa, aiheuttivat kuitenkin ohimenevän turvotuksen muodostumista kasvoihin ja raajoihin, kun niitä annettiin rotille annoksina 1,25 tai 1,5 mg/kg ihon alle (F. Schmidt et al., Contraception, 29, 283, 1984; J.E. Morgan et al., Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 80, 70, (1986). Koska turvotusta aiheuttavien vaikutusten esiintyminen rotilla näiden antagonistien antamisen jälkeen synnytti epäilyksiä niiden turvallisuudesta ihmisten käytössä ja siten jarrutti näiden lääkkeiden otamista kliiniseen käyttöön, on toivottavaa kehittää antagonistisia peptidejä, joilla ei ole näitä sivuvaikutuksia.
25

Keksinnön mukaisesti valmistetut peptidit ovat LHRH:n antagonisteja, joilla on emäksisten peptidien parantunut vesiliukoisuus ja suuri antagonistinen tehokuus, mutta joilla ei ole turvotusta synnyttäviä vaikutuksia. Nämä yhdisteet estävät erittäin tehokkaasti gonadotropiinin vapauttamista aivolisäkerauhasesta nisäkäillä mukaan luettuna ihmiset.
30

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on kaava
35



jossa

X on asyylliryhmä, joka on saatu 1 - 7 hiiliatomia sisältävien, alifaattisten tai alisyklisten karboksyylihappojen suorista tai haarautuneista ketjuista, tai karbamoyyliryhmä,

R^1 on D- tai L-Pro, D- tai L- Δ^3 -Pro, D-Phe, D-Phe(4-Hl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) tai D-Nal(2),

R^2 on D-Phe tai D-Phe(4-Hl),

R^3 on D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) tai D-Nal(2),

R^6 on D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) tai D-Hci(Q) ja

R^{10} on Gly tai D-Ala,

jolloin Hl on fluori, kloori tai bromi ja Q on C_{1-3} -alkyyli, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditiosuolojen valmistamiseksi, jolloin menetelmälle on tunnusomaista, että

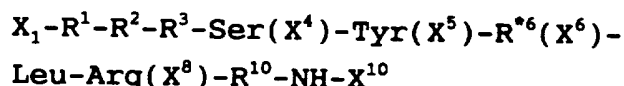
peptidikemiassa tavallisen fragmenttikondensaation avulla kondensoidaan vastaavat peptidifragmentit tai

peptidi rakennetaan asteittain lähtöaminohapoista peptidikemiassa tavallisen faramgnettikondensaation avulla tai kaavan I mukaisessa peptidissä, jossa R^6 on D-Orn tai D-Lys, D-Orn:n tai D-Lys:n vapaa aminoryhmä muutetaan saattamalla reagoimaan alkalisyanaatin kanssa tai yhdisteen kanssa, joka tuottaa syanaatin, tai C_{1-3} -alkyyli-iso-syanaatin kanssa ureidoryhmäksi ja

saadut peptidit mahdollisesti asyloidaan ja/tai muutetaan amideiksi ja

mahdollisesti muutetaan fysiologisesti vaarattomiksi happosuoloiksi.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä syntyy välipeptidejä tai välipeptidihartseja, joilla on kaava



II

35

jossa

X_1 on asyylliryhmä, joka on saatu 1 - 7 hiiliatomia sisältävien alifaattisten tai alisyklisten karboksyyli-

happojen suorista ja haarautuneista ketjuista (erityisesti asetyyli), t-Boc, vety tai karbamoyyli,

X^4 on Ser-hydroksiryhmän suojaryhmä (esimerkiksi bentsyyli, 2,6-diklooribentsyyli),

5 X^5 on Tyr-fenolihydroksyyli-ryhmän suojaryhmä (esimerkiksi bentsyyli, 2,6-diklooribentsyyli, 2-kloori(2-bromi)-bentsyyli-oksikarbonyyli; bentsyyli-oksikarbonyyli),

10 X^6 on Lys- tai Orn-sivuketjuaminoryhmän suojaryhmä (bentsyyli-oksikarbonyyli, 2-klooribentsyyli-oksikarbonyyli),

X^8 on Arg-guanidinoryhmän suojaryhmä (NO_2 , Tos),

X^{10} on bentshydryyli- tai metyylibentshydryyli-ryhmiä sisältävä kantajahartsii,

15 R^1 on D- tai L-Pro, D- tai L- Δ^3 -Pro, D-Phe, D-Phe(4-Hl), d-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) tai D-Nal(2),

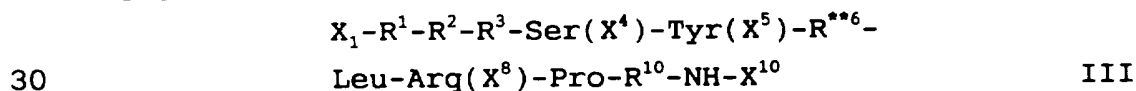
R^2 on D-Phe tai D-Phe(4-Hl),

R^3 on D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) tai D-Nal(2),

20 R^{*6} on D-Lys tai D-Orn, D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) tai D-Hci(Q) ja

R^{10} on Gly tai D-Ala, jolloin Hl on fluori, kloori tai bromi.

25 Erään menettelytavan mukaan esimerkiksi muutetaan kaavan II mukainen peptidi, jossa R^{*6} on D-Lys tai D-Orn ja X^6 on vety, syanaatin tai yhdisteen, joka tuottaa syanaatin (syanaattilähde), avulla kaavan III mukaiseksi peptidiksi:



35 jossa symboleilla X_1 , R^1 , R^2 , R^3 , X^4 , X^5 , X^8 , R^{10} ja X^{10} on ilmoitetut merkitykset ja R^{*6} on Cit, Hci, Cit(Q) tai Hci(Q). Tämä reaktio suoritetaan mieluummin, kun X_1 on asyyli ja kaikki muut jäännökset X on vety.

Sopivia syanaatteja tai syanaatin tuottavia yhdisteitä ovat: alkalisyanaatit (esimerkiksi kaliumsyanaat-

ti), N-alempialkyyli-isosyanaatti (N-etyyli-isosyanaatti). Kaavan II mukaiset peptidit syntetisoidaan mieluiten tunnetun kiinteäfaasitekniikan avulla. Muuttaminen syanaateilla tai syanaatin tuottavilla yhdisteillä suoritetaan liuottimissa, mieluummin aproottisissa liuottimissa kuten esimerkiksi vesipitoisessa DMF:ssa, lämpötiloissa väliltä 0 - 50 °C, mieluummin 0 - 25 °C.

Tämän reaktion edistymistä, toisin sanoen Orn/Lys-peptidien muuttumista vastaaviksi Cit/Hci-peptideiksi, voidaan helposti seurata HPLC:n avulla MeCN-vesipitoisissa TFA-systeemeissä, johtuen Cit/Hci- ja esimerkiksi Cit(etyyli)/Hci(etyyli)peptideille tunnusomaisesta retentioajan pidentyneisyydestä $2,6 \pm 0,3$ minuutilla verrattuna vastaaviin Orn/Lys-peptideihin.

Kaavan I mukaisia peptidejä, joissa X on asyyli-ryhmä, saadaan suoraan suorittamalla lohkaiseminen ja suojauksen poistaminen kaavan II mukaisille välipeptidihartseille, joissa X_1 on asyyli-ryhmä ja R^6 on D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) tai D-Hci(Q), ja kaavan I mukaisia peptidejä, joissa X on karbamoyyli-ryhmä, saadaan kaavan II mukaisista peptidihartseista, joissa X_1 on vety tai Boc, nimittäin lohkaisemalla ja poistamalla suojaus ja sen jälkeen karbamoyloimalla.

Gonadotropiinia vastaan vaikuttava farmaseuttinen valmiste aikaansaadaan sekoittamalla kaavan I mukaista yhdistettä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen kanssa, mukaan luettuna mikropalloset hidastettua vapauttamista varten.

Peptidien määrittelyyn käytetty nimistö on yhtäpitävä biokemian nimistöä käsitelleen IUPAC-IUB-komitean esittämän nimistön kanssa (European J. Biochem., 1984, 138, 9 - 37), jolloin yhdenmukaisesti totunnaisen esitystavan kanssa N-päässä olevan aminoryhmät esiintyvät vasemmalla ja C-pään karboksyyli-ryhmä oikealla. Ilmausta luonnolliset aminohapot käytetään yleisesti luonnollisesti esiintyvistä aminohapoista, joita on proteiineissa ja jotka käsittävät aminohapot Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser,

Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp ja His. Yksittäisistä aminohappojäännöksistä käytetyt lyhennykset perustuvat aminohappojen triviaalisiin nimiin ja ovat Ala, alaniini; Arg, arginiini; Cit, sitrulliini; Gly, glysiini; Hci, homositrulliini; Leu, leusiini; Lys, lyysiini; Pal(3), 3-(3-pyridyyli)alaniini; Nal(2), 3-(2-naftyyli)alaniini; Nal(1), 3-(1-naftyyli)alaniini, Orn, ornitiini; Phe, fenyylialaniini; Phe(4-Cl), 4-kloorifenyylialaniini; Phe(4-F), 4-fluorifenyylialaniini; Pro, proliini; Ser, seriini; Trp, tryptofaani ja tyr, tyrosiini. Kaikki tässä kuvatut aminohapot kuuluvat L-sarjaan, ellei toisin ole mainittu, esimerkiksi D-Trp tarkoittaa D-tryptofaania ja D-Nal(2) tarkoittaa 3-(2-naftyyli)-D-alaniinia. D-Cit(Q) tai D-Hci(Q) tarkoittaa, että sitrullin (homositrullin) ureidoosan aminoryhmän H-atomi on korvattu alkyyli-ryhmällä Q. Muita käytettyjä lyhennyksiä ovat

	ACOH	etikkahappo
	AcOEt	etyyliasetatti
20	Ac ₂ O	etikkahapon anhydridi
	Boc-	tert. butyylioksikarbonyyli-
	DIC	di-isopropyylikarbodi-imidi
	DIEA	N,N-di-isopropyylietyyliamiini
	DMF	dimetyyliformamidi
25	HOBT	1-hydroksibentseenitriatsolihydraatti
	HPLC	korkeapainenestekromatografia
	MeOH	metyylialkoholi
	TEA	trietyyliamiini
	DCC	disykloheksyylikarbodi-imidi
30	MeCN	asetonitriili
	IPOH	isopropanoli
	Z(2-Cl)	2-klooribentsyylioksikarbonyyli
	DCB	2,6-diklooribentsyyli
	Tos	p-tolueenisulfonyyli
35	TFA	trifluorietikkahappo
	Z	bentsyylioksikarbonyyli

Erityisen hyvinä pidetään kaavan I mukaisia LHRH-analogeja, joissa;

- X on asetyyli tai karbamoyyli,
R¹ on D-Phe(4-Cl), D-Nal(2), Pro tai D-Phe,
5 R² on D-Phe(4-Cl) tai D-Phe(4-F),
R³ on D-Trp tai D-Pal(3),
R⁶ on D-Cit, D-Hci, D-Cit(etyyli), D-Hci(etyyli) ja
R¹⁰ on D-Ala.

- Kuten edellä on mainittu, keksinnön mukainen peptidien
10 valmistus tapahtuu siten, että ne valmistetaan peptidikemias-
sa yleisesti käytetyn fragmenttikondensaation avulla vastaa-
vista peptidifragmenteissa tai peptidikemiassa tavallisen
asteittaisen rakentamisen avulla, tai siten että kaavan I mu-
kaisessa peptidissä, jossa R⁶ on D-Orn tai D-Lys, D-Orn:n tai
15 D-Lys:n vapaa aminoryhmä muutetaan antamalla reagoida alka-
lisyanaatin tai yhdisteen, joka tuottaa syanaatin, tai C₁₋₃-
alkyyli-isosyanaatin kanssa ureidoryhmäksi, ja saadut pep-
tidit mahdollisesti asyloidaan ja/tai muutetaan amideiksi
ja mahdollisesti muutetaan fysiologisesti vaarattomiksi
20 happosuoloiksi.

- Asteittainen rakentaminen tapahtuu esimerkiksi si-
ten, että ensin sidotaan karboksyyliipään aminohappo gly-
siini tai D-alaniini tai niiden amidien, joissa pysyvä
 α -aminoryhmä on suojattu, tähän tarkoitukseen yleisesti
25 käytettyyn synteettiseen kantajaan kovalenttisesti, α -ami-
non suojaryhmä lohkaistaan pois, näin saatuun vapaaseen
aminoryhmään sidotaan lähinnä seuraava suojattu aminohap-
po sen karboksyyliiryhmän kautta, sitten taas lohkaistaan
tämän toisen aminohapon α -aminon suojaryhmä pois, tähän
30 sidotaan seuraava aminohappo ja tällä tavoin askel aske-
leelta liitetään syntetisoitavan peptidin muut aminoha-
pot oikeassa järjestyksessä ja kun kaikki aminohapot on
liitetty, patenttivaatimuksen 1 mukainen valmis peptidi
lohkaistaan pois kantajasta ja mahdollisesti muut läsnä
35 olevat sivufunktioiden suojaryhmät lohkaistaan pois.

Fragmenttikytkemisessä käytetään mieluummin ilman rase-
 semoitumista tapahtuvaa atsidikytkemistä tai disyklohek-
 syylikarbodi-imidi/1-hydroksibentsotriatsoli- tai DCC/3-
 hydroksi-4-okso-3,4-dihydro-1,2,3-bentsotriatsiini-mene-
 5 telmää. Voidaan myös käyttää hyväksi fragmenttien aktivoituja
 estereitä (DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi).

Aminohappojen asteittaiseen kondensaatioon sopivat
 erityisen hyvin bentsyylioksidikarbonyyli-aminohappojen akti-
 voidut esterit, kuten esimerkiksi N-hydroksisukkinimi-
 10 diesteri tai 2,4,5-trikloorifenyyliesteri ja 4-nitrofe-
 nyyliesteri. Kahden jälkimmäisen aktiiviesterin aminolyy-
 siä voidaan erittäin hyvin katalysoida N-hydroksiyhdis-
 teiden avulla, joiden happamuus on suurin piirtein etikka-
 hapon luokkaa, kuten esimerkiksi 1-hydroksibentsotriatso-
 15 lin avulla.

Väliaminonsuojaryhmiksi soveltuvat poishydrattavat
 ryhmät, kuten esimerkiksi bentsyylioksidikarbonyylijäännös
 (= Z-jäännös) tai heikon happamuuden avulla pois lohkais-
 tavat ryhmät, kuten esimerkiksi 2-(p-difenyyli)isopropyyli-
 20 oksikarbonyyli- tai 2-(3,5-dimetoksifenyyli)isopropyyli-
 oksikarbonyylijäännös.

Asteittainen kondensaatio tapahtuu suorittamalla
 synteesi vastaavista, mahdollisesti tavalliseen tapaan
 suojatuista aminohapoista totunnaiseen tapaan. Samoin on
 25 mahdollista käyttää automaattista peptidinsyntetisoijaa,
 esimerkiksi Beckman Model 990 -peptidinsyntetisoijaa,
 mahdollisesti käyttäen yleiseen tapaan kaupallisesti saa-
 tavissa olevia suojattuja aminohappoja.

Tämä synteesi tapahtuu esimerkiksi tätä tarkoitus-
 30 ta varten yleisellä tavalla vastaavista suojatuista ami-
 nohapoista siten, että ensin sidotaan syntetisoitavan pep-
 tidin karboksyyliterminaalinen aminohappo, jonka pysyvä
 α -aminoryhmä on suojattu, tähän tarkoitukseen yleisesti
 käytettyyn synteettiseen kantaja-aineeseen kovalenttises-
 35 ti, α -aminon suojaryhmä lohkaistaan pois, näin saatuun va-
 paaseen aminoryhmään sidotaan lähinnä seuraava suojattu

aminohappo sen karboksyyli­ryhmän kautta, sitten jälleen tämän toisen aminohapon α -aminon suojaryhmä lohkaistaan pois, tähän sidotaan seuraava aminohappo ja tällä tavoin asekeleelta liitetään syntetisoitavan peptidin muut ami-
5 nohapot oikeassa järjestyksessä ja kun kaikki aminohapot on liitetty, lohkaistaan valmis peptidi kantajasta pois ja mahdollisesti lisäksi läsnä olevat sivufunktioiden suo-
jaryhmät lohkaistaan pois.

Aminohappojen liittäm­isreaktio tapahtuu lämpötila-
10 alueella 10 - 40 °C, mieluummin 20 - 30 °C, mahdollisesti tähän tarkoitukseen yleisesti käytetyssä inertissä liuot-
timessa tai suspension väliaineessa (esimerkiksi dikloori-
metaanissa), jolloin voidaan mahdollisesti liukoisuuden
parantamiseksi lisätä 20 %:iin saakka dimetyyli­formamidia.

15 Synteettisenä kantajamateriaalina tulevat kysymyk-
seen synteettiset polymeerit, esimerkiksi turpoava poly-
styreeniharts­i, joka on helmien muodossa (esimerkiksi,
kloorimetyloitu kopolymeraatti, joka on muodostunut poly-
styreenistä ja 1 %:sta divinyylibentseeniä). Pysyvien
20 α -aminoryhmien suojaryhminä tulevat kysymykseen esimer-
kiksi: tertiaarinen butyylioksikarbonyyli­ryhmä, karbobent-
soksiryhmä tai karbobentstioryhmä (joissa mahdollisesti
on kulloinkin p-bromi tai p-nitrobentsyyli­jäännös), tri-
fluoriasetyyli­ryhmä, ftalyyli­jäännös, o-nitrofenoksiase-
25 tyyli­ryhmä, trityyli­ryhmä, p-tolueenisulfonyyli­ryhmä,
bentsyyli­ryhmä, bentseeniytimessä substituoidut bentsyy-
li­jäännökset (p-bromi- tai p-nitrobentsyyli­jäännös),
 α -fenyylietyyli­jäännös. Tämän lisäksi viitataan myös Jes-
se P. Greensteinin ja Milton Winitzin kirjaan Chemistry
30 of Amino Acids, New York 1961, John Wiley and Sons, Inc.,
osa 2, esimerkiksi sivuille 883 ja sitä seuraavat sivut,
sekä teokseen The Peptides, osa 2, toim. E. Gross ja J.
Meienhofer, Academic, New York, taulukoihin III ja IV.
Nämä suojaryhmät sopivat periaatteessa myös kysymykseen
35 tulevien aminohappojen muiden funktionaalisten sivuryhmien
(OH-ryhmät, NH₂-ryhmät) suojaamiseen.

Läsnä olevat hydroksiryhmät (seriini, treoniini) suojataan mieluummin bentsyyliiryhmien ja vastaavien ryhmien avulla. Muut aminoryhmät kuin pysyvät α -aminoryhmät (esimerkiksi ω -asemassa olevat aminoryhmät; arginiinin guanidinoryhmä) suojataan mieluummin nitroryhmillä.

Yksittäisten aminohappojen liittäminen toisiinsa tapahtuu tähän tarkoitukseen yleisesti käytetyillä menetelmillä. Erityisesti tulevat kysymykseen:

symmetristen anhydridien menetelmä
 (disykloheksyylikarbodi-imidin läsnä ollessa)
 karbodi-imidi-menetelmä,
 karbodi-imidi-hydroksibentsotriatsoli-menetelmä
 (katso The Peptids, osa 2, toim. E. Gross ja J. Meienhofer).

Arginiinin liittämiseen käytetään mieluummin karbodi-imidi-menetelmää, asparagiinin sekä glutamiinin liittämiseen käytetään mieluummin karbodi-imidi-hydroksibentsotriatsoli-menetelmää (katso The Peptids, osa 2, toim. E. Gross ja J. Meienhofer). Muita aminohappoja varten käytetään yleensä symmetristen tai seka-anhydridien menetelmää.

Kaavan 1 mukaisten peptidien, joissa kuitenkin R^6 on D-Orn tai D-Lys (lähtöaineita syanaatin avulla muuttamista varten), valmistus voi tapahtua esimerkiksi mainitun asteittaisen peptidinrakentamisen tai fragmenttikondensaation avulla.

Kun valmistetaan keksinnön mukaisesti peptidejä, joissa R^6 on Cit(Q) tai Hci(Q), käytetään peptidin synteesissä yleensä vastaavaa päässä olevaa ureidoryhmässä alkyyliryhmällä Q substituoitua Cit:a tai Hci:a.

Peptidien I muuttaminen niiden happoadditiosuoloiksi voidaan suorittaa antamalla niiden reagoida happojen kanssa sinänsä tunnetulla tavalla. Päinvastoin voidaan vapaiden peptidien vapauttaminen suorittaa antamalla niiden happoadditiosuolojen reagoida emästen kanssa.

Valmistusmenetelmässä on siis kysymys esimerkiksi yksinomaisesta kiinteäfaasitekniikasta, osittaisesta kiinteäfaasitekniikasta, fragmenttikondensaatiosta tai klassisesta liuosfaasisynteesistä. (Katso M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, 1984).

Esimerkiksi yksinomaisen kiinteäfaasisynteesin menetelmiä on kuvattu oppikirjassa "Solid Phase Peptide Synthesis", J.M. Stewart ja J.D. Young, Pierce Chem. Company, Rockford, III., 1984 (2. painos), G. Barany ja R.B. Merrifield, "The Peptides", kappale 1, s. 1 - 285, 1979, Academic Press, Inc.

Klassinen liuosynteesi on kuvattu yksityiskohtaisesti julkaisussa "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl). Synthese von Peptiden", E. Wunsch (toimittaja) (1974), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Saksan Liittotasavalta.

Sellaisissa synteeseissä on tavallista, että eri aminohappojäännösten reaktiiviset sivuketjun funktionaaliset ryhmät suojataan sopivien suojaryhmien avulla, jolloin estää kemiallisen reaktion tässä kohdassa, kunnes ryhmä lopuksi otetaan pois. Yleensä niissä on myös tavallista aminohapon tai fragmentin α -aminoryhmän suojaaminen siksi aikaa kun tämä kokonaisuus reagoi karboksyyli-ryhmän avulla, minkä jälkeen seuraa α -aminon suojaryhmän selektiivinen poistaminen, jotta seuraava reaktio voisi tapahtua tässä kohdassa. Sen mukaisesti niissä on samoin tavallista valmistaa synteesin yhtenä vaiheena välituote, joka käsittää jokaisen aminohappojäännöksistä ja se on halutun järjestyksen mukaisesti liitetty peptidiketjuun, jolloin sivuketjusuojaryhmät liitetään sopiviin jäännöksiin.

Tämän keksinnön mukaiset menetelmät voidaan suorittaa lukuisia tukifaaseja käyttämällä. Nämä tukifaasit voivat olla esimerkiksi hartseja, kuten bentshydryyliamiinihartseja (sopivasti 2 % verkkokytKentää), p-metyyli-bents-hydryyliamiinihartseja (sopivasti 2 % verkkokytKentää), tai vastaavia.

Kaavassa II:

- R^1 , R^2 ja R^3 ovat edelleen yllä lähemmin kuvatun mukaisia.
- X_1 on vety tai asyyliiryhmä, joka on saatu 1 - 7
 5 hiiliatomia sisältävien alifaattisten tai alisyklisten karboksyylihappojen suorista tai haarautuneista ketjuista, tai α -aminon suojaryhmä. X_1 :n tarkoittamat α -aminon suojaryhmät ovat sellaisia, jotka alan kehitystason mukaan ovat tunnettuja käytettäväksi asteittaisessa synteesissä
 10 polypeptidejä varten. α -aminon suojaryhmäluokista, joita voidaan käyttää X^1 :nä, voidaan mainita fluorenyylimetoksi-karbonyyli (Fmoc) tai t-butoksikarbonyyli (Boc).
- X^4 voi olla sopiva Ser:n hydroksyyliiryhmän suoja-
 ryhmä, kuten esimerkiksi bentsyyli (Bzl) ja 2,6-dikloori-
 15 bentsyyli (DCB). Parhaana pidetty suojaryhmä on Bzl.
- X^5 voi olla sopiva Tyr:n fenyylihydroksyyliiryhmän suojaryhmä, kuten esimerkiksi Bzl, 2-Br-Z ja 2,6-dikloori-
 bentsyyli (DCB). Parhaana pidetty suojaryhmä on DCB.
- X^6 on Lys:n tai Orn:n sivuketjuaminoryhmän sopiva
 20 suojaryhmä. Esimerkkejä sopivista sivuketjuaminon suoja-
 ryhmistä ovat bentsyylioksikarbonyyli (Z) ja 2-klooribent-
 syylioksikarbonyyli [$\bar{Z}$ -(2-Cl)].
- X^8 on sopiva suojaryhmä Arg:n guanidinoryhmälle,
 kuten esimerkiksi nitro, Tos, metyyli-(t-butylibents)-
 25 sulfonyyli, 4-metoksi-2,3,6-trimetyylibentssulfonyyli;
 parhaana pidetty ryhmä on Tos.
- X^{10} on amidiiryhmää suojaava bentshydriyli- tai
 metyylibentshydriyliiryhmä, joka on kiinnittynyt tähän
 tarkoitukseen yleisesti käytettyyn kantajahartsiin (esi-
 30 merkiksi 98 % styreeni - 2 % dinyylibentseenikopolyme-
 raatti, joka sisältää bentshydriyliamiini- tai metyyli-
 bentshydriyliamiiniryhmiä).

Sivuketjuaminon suojaryhmän valinta ei ole kriit-
 tinen, mutta yleensä valitaan sellainen, joka ei poistu,
 35 kun α -aminon suojaryhmiä poistetaan synteesin aikana.

Kaavan I mukaiset peptidit valmistetaan kaavan II mukaisista välipeptidihartseista alan nykytason perusteella tunnettujen menetelmien mukaan.

Kaavan II mukaisten välipeptidihartsien kiinteäfaasisynteesi suoritetaan oleellisesti siten kuin Merrifield, J. on kuvannut julkaisussa J. Am. Chem. Soc., 85, s. 2 149 (1963). Kiinteäfaasisynteesi aloitetaan peptidin C-terminaalista päästä kytkemällä suojattu α -aminohappo sopivaan hartsiin. Tällainen lähtöaine voidaan valmistaa sitomalla α -aminosuojattu Gly tai D-Ala amidisidoksella bentsihydryyliamiinihartsiin. Sellaista kantajahartseja on yleisesti saatavissa kaupallisesti ja niitä käytetään yleensä, kun toivotussa syntetisoitavassa polypeptidissä on C-päässä α -karboksiamidi.

Eräässä synteesin suoritussuodossa suojataan Gly:n tai D-Ala:n primaarinen aminoryhmä t-butoksikarbonyloivalta vaikuttaja-aineella ja kytkeminen suoritetaan käyttämällä jotakin tunnetuista dialkylikarbodi-imidi-kytkentämenetelmistä.

Sopivan kytkentäreagenssin valinta on asiantuntijalle tuttua. Erityisen sopiva kytkentäreagenssi on N,N'-di-isopropylikarbodi-imidi (DIC).

Aktivoivia reagensseja ja niiden käyttöä peptidikytkennässä on kuvattu teoksessa M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, 1984.

Jokainen suojattu aminohappo tai aminohappojakso lisätään kiinteäfaasireaktoriin käyttäen sen suurin piirtein kaksinkertaista ylimäärää ja kytkeminen voidaan suorittaa väliaineessa DMF:CH₂Cl₂ (1:1) tai pelkässä CH₂Cl₂:ssa. Sellaissa tapauksissa, joissa esiintyy epätäydellistä kytkeytymistä, kytkentämenetelmä toistetaan, ennen kuin poistetaan α -aminon suojaryhmä ennen seuraavan aminohapon kanssa kytkemistä. Kytkentäreaktion tulosta tutkitaan kussakin synteesin vaiheessa mieluummin ninhydriinireaktion avulla kuten on kuvanneet E. Kaiser et al., Anal. Biochem., 34, 595 (1970).

Sen jälkeen kun kaavan II mukaisten peptidihartsien haluttu aminohapposekvenssi on saatu valmiiksi, poistetaan päässä oleva Boc-ryhmä ja haluttaessa suoritetaan N-terminaalinen asylointi käyttämällä sopivaa asyylihydridiä tai happokloridia 50-kertaisena ylimääränä halogenoidussa hiilivetyliuotuksessa; sopivasti etikkahapon anhydridiä metyleenikloridissa 30 minuutin ajan. Välipeptidi voidaan poistaa kantajahartsista käsittelemällä sitä sellaisella reagenssilla kuin esimerkiksi nestemäisellä fluorivedyllä, joka ei ainoastaan lohkaise peptidiä irti hartsista, vaan lohkaisee myös pois kaikki muut sivuketjusuojaryhmät X^4 , X^5 , X^8 , X^{10} ja X^6 , mikäli se on läsnä.

Mikäli lohkaisemiseen käytetään fluorivetyä, silloin ovat reaktioputkessa läsnä anisoli tai m-kresoli tai haluttaessa metyylietyylisulfidi huuhteluaineena.

Peptidien II, joissa R^{*6} on D-Lys tai D-Orn ja X^6 on vety, muuttaminen peptideiksi I syanaatin avulla on kuvattu edellisillä sivuilla.

Jos asylointi jätetään pois, johtaa kaavan II mukaisten peptidihartsien käsitteleminen fluorivedyllä sellaisten dekapeptidien muodostumiseen, joissa on vapaita omega-amino- ja/tai α -aminoryhmiä ja jotka vastaavat kaavaa II, jossa X_1 , X^4 , X^5 , X^8 , X^{10} ja, mikäli se on läsnä, X^6 ovat vety. Nämä vapaat peptidit muutetaan kaavan I mukaisiksi peptideiksi, joissa X on karbamoyyliryhmä, nimittäin käsittelemällä syanaatilla, sopivasti alkalimetallisyanaatilla, mieluummin kaliumsyanaatilla. Viimeksi mainittua reaktiota, toisin sanoen $H_2N:n$ muuttamista $H_2N-CO-NH:$ ksi peptidien aminopäässä ja Orn/Lys-jäännösten muuttamista Cit/Hci-jäännöksiksi, voidaan helposti tarkkailla HPLC:n avulla käyttäen MeCN-vesipitoisia TFA-systeemejä, johtuen karbamoyloiduille peptideille tunnusomaisesti retentioajan pidentyneisyydestä 2 - 3 minuutin verran, toisin sanoen $H_2N-CO-NH$ -ryhmän omaaville yhdisteille, H_2N -ryhmän omaaviin yhdisteisiin verrattuna tunnusomaisesti.

Vaihtoehtoisesti ja mieluummin saadaan peptidit I, joissa X = asyyli tai karbamoyyli, suoraan kaavan II mukaisista välipeptidi-hartseista, joissa X_1 on asyyli tai karbamoyyli ja R^{*6} on D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) tai D-Hci(Q),
 5 lohkaisemalla ja poistamalla lohkaisemalla suojarahmät.

Vaikka tässä kuvataan myös kaavan I mukaisten yhdisteiden yksinomainen kiinteäfaasisynteesi ja osittainen kiinteäfaasisynteesi, voitaisiin yhdisteet valmistaa klasisisten liuosfaasimenetelmienkin avulla.

10 Esimerkeissä kuvatulla tavalla valmistettuja, synteettisiä peptidejä verrattiin kahteen tehokkaimmasta viime aikoina kuvatuista LHRH:n antagonisteista, nimittäin yhdisteisiin $\bar{A}c$ -D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰₇-LHRH (ORG-30276) (Coy et al., Endocrinology, 100, 1 445,
 15 1982) ja $\bar{A}c$ -D-Nal(2)¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶₇-LHRH (ORF 18260) (Rivier et al., teoksessa: Vickery, B.H., Nestor, Jr., J.J., Hafez, E.S.E. (toimittajat), "LHRH and Its Analogs", s. 11 - 22, MTP Press, Lancaster, UK, 1984), ja todettiin, että ne osoittivat yhtä voimakkaita estäviä
 20 vaikutuksia sekä in vitro että in vivo, tosin sillä poikkeuksella, että päinvastoin kuin kontrollipeptideillä niillä ei ilmennyt in vivo turvotusvaikutuksia.

Hormonaalisia vaikutuksia in vitro verrattiin rottien aivolisäkerauhasen superfundamentoituihin solusysteemeihin (S. Vigh ja A.V. Schally, Peptides, 5 suppl. 1: 241 - 247, 1984), joissa LHRH:n (ja muiden vapauttavien hormonien) vaikutus voidaan todeta tarkkaan, koska LH:n (tai muiden aivolisäkerauhashormonien) määrä, joka
 30 verrannollinen käytetyn peptidin hormoninvapautustehoon, vaan on myös helposti mitattavissa hyvin kuvatun radioimmunanalyysin avulla.

LHRH:n antagonistin tehokkuuden määrittämiseksi käytetään superfundamentointiin seoksia, jotka sisältävät
 35 LHRH:a samana pysyvän konsentraation (tavallisesti 1 nM) ja antagonistia vaihtelevia konsentraatioita, jotta saa-

taisiin määritettyä se molekyylinen antagonistin suhde LHRH:n, jossa LHRH:n vaikutus on täysin estynyt. Nämä suhteet ovat suunnilleen 5 kummankin kaavan I mukaisen peptidin ja vertailupeptidin kohdalla, kun rotan aivo-
 5 lisäkerauhasen solusysteemiä esi-inkuboidaan etukäteen antagonistien kanssa 9 minuutin ajan.

In vivo -ovulaationestokokeessa (A. Corbin ja C.W. Beattie; Endocr. Res. Commun. 2, 1 - 23, 1975; D.H. Coy et al., Endocrinology, 100, 1 445, 1982) todettiin kaa-
 10 van I mukaisten peptidien kohdalla samoin, että ne ovat suurin piirtein yhtä tehokkaita kuin kontrolliantagonis-
 ti, nimittäin kullakin peptidillä voitiin havaita ovulaa-
 tion 87,5 - 100 % estyminen ihon alle annetun annoksen ollessa 1 - 3 µg/rotta.

Schmidtin et al. (Contraception, 29, 283 - 289, 1984) turvotuskokeessa voitiin kuitenkin todeta selvä ero kontrollipeptidien ja kaavan I mukaisten peptidien välillä. Kontrollipeptidit aiheuttivat turvotusta kasvois-
 15 sa ja raajoissa, kun niitä annettiin rotille ihon alle annoksina 1,25 ja 1,5 mg/kg. Kaavan I mukaisilla peptideil-
 20 lä ei voitu havaita sellaista vastavaikutusta, kun niitä annettiin ihon alle annoksena 1,5 mg/kg.

Suoritetuissa kokeissa jaettiin rotat kolmeen ryhmään, siten että kulloinkin oli viisi rottia ryhmää koh-
 25 den ja tutkittua yhdistettä kohden. Suoritettiin vertailu tunnetun, alan kehitystason mukaisen yhdisteen kanssa, jolla on nimitys ORG 30276 (N-Ac-D-p-Cl-Phe^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰).

Ryhmille annettiin kerran päivässä kahtena perä-
 30 käisenä päivänä ruiskeena ihon alle LHRH:n antagonisteja annostuksena 1,5 mg/kg. Kontrolliryhmälle annettiin ruiskeena ainoastaan laimennusainetta. Rottia tarkkailtiin 5 tunnin ajan päivää kohden. Rottien reaktiot luokiteltiin seuraavasti: NR ei näkyvää vastavaikutusta, PR osit-
 35 tainen vastavaikutus: turvotusta nenän alueella ja nenän vierusalueella, FR täydellinen vastavaikutus: turvotusta kasvoissa ja turvonneet raajat.

Alla olevassa taulukossa 1 on yhteenveto tulok-
sista.

Taulukko 1

5	LHRH:n antagonisti	1. päivä			2. päivä		
		NR	PR	FR	NR	PR	FR
	ORG 30276	3	7	0	0	0	10
	kontrolli	9	0	0	9	0	0
	esimerkki I	8	0	0	9	0*	0
10	esimerkki III	8	0	0	8	0	0
	esimerkki IV	9	0	0	9	0	0
	esimerkki V	9	0	0	8	1*	0
	esimerkki XX	9	0	0	8	1*	0
	esimerkki XXI	9	0	0	9	0	0
15	esimerkki XXVI	8	0	0	8	0	0
	esimerkki XXVII	9	0	0	9	0	0

* hyvin vähäistä kasvoturvotusta

20 Kaikki valmistetut peptidit ovat täysin tehokkai-
ta LHRH-vapautuksen estämisessä jossakin määrin järkevi-
nä konsentraatioina in vitro, vaikka useimmat ovat hiu-
kan vähemmän tehokkaita kuin kysymyksessä olevat in vitro-
standardit; tosin nämä peptidit ovat in vivo paljon te-
25 hokkaampia.

Tämä osoitettiin kokeessa, joka koski histamiinin
vapauttamista in vitro vatsakalvon syöttösoluista, joka
koe suoritettiin yhdenmukaisesti Morganin et al. (Int.
Archs. Allergy appl. Immun. 80, 70, 1986) menetelmän kans-
30 sa.

Histamiinin vapauttaminen in vitro

Tässä kokeessa rottia nukutettiin eetterin avulla
ja vatsaontelotulehdusnestesoluja otettiin talteen pese-
mällä niitä 12 ml:lla syöttösoluväliainetta (MCM) (150 mM
35 NaCl; 3 mM KCl; 3,0 mM Na₂HPO₄; 3,5 mM KH₂PO₄; 0,98 mM
CaCl₂; 5,6 mM dekstroosi; 0,1 % vasikan seerumin albumiini-

ni; 0,1 % gelatiini ja 10 E/ml hepariinia) [9]. Koottiin soluja 4:ltä tai 5:ltä rotalta, ne sentrifugoitiin nopeudella 120 G, uudelleensuspendoitiin MCM:een konsentraatioksi $0,5 \times 10^6$ ml ja 1 ml annostettiin 12 x 75 mm:n polyetyleeniputkiin. Putkien annettiin tasoittua 15 minuutin ajan 37 °C:een ja niitä inkuboitiin 60 minuutin ajan yksin (histamiinin taustavapauttaminen), 48/80:n kanssa (positiivinen kontrolli) (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) tai sopivien konsentraatioiden kanssa (1 ng - 10 µg/ml) LHRH:n antagonisteja. Reaktio lopetettiin jäädyttämällä putket 4 °C:een. Putket sentrifugoitiin; supernatantit poistettiin ja niitä säilytettiin -20 °C:ssa, kunnes niistä tutkittiin histamiini. Kokeet suoritettiin kulloinkin kahdesti. Solujen kokonaishistamiini osoitettiin keittämällä 10 minuutin ajan. Vastavaikutuksena antagonisteille vapautettu histamiini ilmoitettiin prosenttimääränä koko vapautumista. Nämä konsentraatiot, joissa vapautui suurin piirtein 50 % koko syöttösolujen histamiinista (HRD_{50} µg/ml), määritettiin jokaiselle antagonistille. Tuloksista on esitetty yhteenveto kuviossa 1.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistettua LHRH-analogia, jossa 6-asemassa on D-sitrulliini, verrattiin rakenteeltaan läheiseen, julkaisusta Z. Naturforsch. 42b (1987) 101 - 106 tunnettuun peptidiin, jossa 6-asemassa on D,L-sitrulliini.

50 päivää vanhoja Sprague-Dawley-naarasrottia (paino 200 - 230 g) käsiteltiin dimetyylilibentsantraseenillä (DMBA; 20 mg/eläin) suun kautta. Noin 20 päivän kuluessa voitiin todeta ensimmäiset rintakasvaimet. Kasvaimen paino määritettiin Druckreyn menetelmällä [Druckrey, H., Steinhoff, D., Nakayama, M., Preussmann, R., Anger, K.: Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan., Dtsch. Med. Wschr. 88 (1963) 651] vertaamalla kunkin kasvaimen tilavuutta etukäteen muodostettujen plastiliini-

mallien tilavuuteen. Kasvaimen paino määritettiin kertomalla mallin paino tekijällä, joka muistutti plastiliinin ja kasvainkudosten ominaispainoja. Tämän menetelmän validointi suoritettiin korreloimalla 99 palpoidun kasvaimen painot painoihin, jotka saatiin punnitsemalla suoraan irtileikattu kasvain. Korrelaatiokerroin oli 0,98. Kun kokonaiskasvainmassa oli noin 1 g, eläimet jaettiin sattumanvaraisesti käsittelyryhmiin ja kontrolliryhmiin, joissa kussakin oli 7 eläintä, ja hoito aloitettiin välittömästi.

Testattavat yhdisteet olivat Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (D-muoto; D-20761), Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-L-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (L-muoto, D-21378) ja Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D,L-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (DL-muoto, D-21385). Yhdisteet injektoidiin ihon alle yhtenä annoksena; annoksen suuruus oli 3,16 mg/kg. Koe päätettiin 21 päivän kuluttua ja kasvaimen paino määritettiin. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa 2.

Taulukko 2

	D-20761 (D-muoto)	D-21385 (DL-muoto)	D-21378 (L-muoto)	kontrolli
Keskimääräinen kasvaimen paino g:ina 21 päivän kuluttua koeyhdisteen injektioista	0,45	8,6	9,4	9,45

Kun rottia, joilla oli DMBA:lla indusoituja kasvaimia, hoidettiin yhdellä suurella annoksella (3,16 mg/kg) valmisteita D-20761 (D-muoto), D-21378 (L-muoto) ja D-21385 (DL-muoto), havaittiin, että L-muoto oli täysin tehoton estämään kasvaimen kasvua. Myös DL-muoto oli lähes tehoton: saatiin vain 9 %:n inhibitio kontrolliin

verrattuna. Sitä vastoin D-muoto esti kasvaimen kasvua hyvin voimakkaasti eli 95 % kontrolliin verrattuna.

Nämä koetulokset osoittavat, että D-muoto toimii hyvin spesifisesti sekä DL- että L-muotoon verrattuna.

5 Kaikilla peptideillä todettiin ovulaatio estävä vaikutus naarasnisäkkäillä hyvin alhaisina annoksina. Kaavan I mukaiset peptidit annettiin usein farmaseuttisesti hyväksyttävien, ei myrkyllisten suolojen, kuten esimerkiksi happoadditiosuolojen, muodossa. Esimerkkejä
10 sellaisista happoadditiosuoloista ovat hydrokloridi, hydrobromidi, sulfaatti, fosfaatti, fumaraatti, glukonaatti, tannaatti, maleaatti, asetaatti, sitraatti, bentsonaatti, sukkinaatti, alginaatti, pamoatti, malaatti, askorbaatti, tartraatti ja vastaavat. Kun vaikuttava aine annetaan
15 tablettimuodossa, voi tabletti sisältää farmaseuttisesti hyväksyttävää laimennusainetta, jossa on sideainetta, kuten esimerkiksi traganttia, maissitärkkelystä tai gelatiinia; hajotusainetta, kuten algiinihappoa ja liukuainetta, kuten magnesiumstearaattia.

20 Kun antaminen halutaan suorittaa nestemäisessä muodossa, voidaan käyttää makeutusainetta ja/tai makuainetta farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen osana, ja antamisen tapahtuessa laskimoon se suoritetaan isotoonisessa suolaliuoksessa, fosfaattipuskuriliuoksissa tai vastaavassa.

25 Farmaseuttiset valmisteet sisältävät tavallisesti peptidin yhdessä tavanomaisen, farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen kanssa. Annos on yleensä suurin piirtein 1 - 100 mikrogrammaa peptidiä kilogrammaa kohden
30 saajan ruumiinpainoa antamisen tapahtuessa laskimoon; suun kautta annettavat annokset ovat suurempia. Yleensä tapahtuu koehenkilöiden hoito näillä peptideillä samalla tavoin kuin kliininen hoito muilla LHRH:n antagonisteilla.

35 Näitä peptidejä voidaan antaa nisäkkäille laskimoon, ihon alle, lihaksen sisään, suun kautta, nenän si-

sään tai emättimen sisään, sikiävyyden ehkäisyn ja/tai kontrollin aikaansaamiseksi ja samoin käyttötapauksissa, joissa tarvitaan ohimenevää sukurauhasaktiivisuuden vaimenemista, kuten esimerkiksi hoidettaessa ennen aikaista puberteettia tai sädehoidon tai kemoterapian aikana.

5 Tepsivät annokset vaihtelevat kulloinkin antamismuodon ja kulloisenkin hoidettavan nisäkäslajin mukaan. Esimerkki tyypillisestä annostusmuodosta on fysiologinen suolaliuos, jossa on peptidiä, ja tätä annetaan annoksena suurin piirtein 0,1 - 2,5 mg/kg ruumiinpainoa. Peptidin antaminen suun kautta voi tapahtua joko kiinteänä tai nestemäisenä muotona.

10

Vaikka keksintö on kuvattu huomioiden parhaana pidetty suoritusmuoto, tulisi olla itsestään selvää, että voidaan tehdä vaihdoksia ja muutoksia, jotka ovat asiantuntijalle ilmeisen selviä, ilman että poiketaan oheisten patenttivaatimusten rajoittamalta keksinnön alueelta. Keksinnössä voidaan samoin käyttää alan kehitystason mukaisia korvaamisia, jotka eivät oleellisesti poikkea suorituksesta.

15

20

SB-030, SB-075 ja SB-088 ovat, kuten jäljempänä on kuvattu tarkemmin, decapeptidejä, joilla on erityisen edullisia vaikutuksia:

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-R³-Ser-Tyr-R⁶-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

25 SB-030, R³ = D-Trp, R⁶ = D-Cit;
SB-075, R³ = D-Pal, R⁶ = D-Cit;
SB-088, R³ = D-Pal, R⁶ = D-Hci.

Rakenneosiin sisältyvistä aminohapoista eivät D-Pal, D-Cit ja D-Hci ole kaupallisesti saatavissa. D-Pal vaatii täydellisen synteesin, joka alkaa dietyyliasetamidomalonaatista ja 3-pikolyylikloridista ja suoritetaan tunnetulla tavalla. D-Cit ja D-Hci voidaan helposti valmistaa kaupallisesti saatavista diaminohapoista, kuten esimerkiksi aminohaposta D-Orn tai D-Lys.

30

Jokaisella peptidillä ilmenee voimakas LHRH:a estävä vaikutus, kuten alla on osoitettu, eikä ollenkaan turvotusta aiheuttavia sivuvaikutuksia.

Taulukko 3

5 SB-030:n, SB-075:n ja SB-088:n LHRH:a estävä vaikutus

10	Peptidi	LHRH:n (3 nM) % estyminen ekvimolaarisella määrällä peptidiä ajan-		Ovulaationesto-	
		kohtana		koe	
		0 min.	2 tunnin kulutua	annos (µg)	% esto
15	SB-030	83	58	1,5	50
				3,0	100
	SB-088	86	60	1,5	66
				2,0	83
20	SB-075	89	54	3,0	100
				1,5	75
				1,0	100

Lyhennykset: Aminohapot ja suojaryhmät on lyhennetty kuten IUPAC IUB JCBN on suositellut [Eur. J. Biochem. 138, 9 - 37 (1984)]. Muita lyhennyksiä ovat: Boc₂O, di-t-butyylidikarbonaatti; DCM, di-kloorimetaani; TLC/TLE, ohutkerroskromatografia/elektroforeesi silika-

25 geelilevyllä.

30 SB-030:lla on SB-075:een ja SB-088:aan verrattuna se etu, että se sisältää vain yhden epätavallisen aminohapon, nimittäin aminohapon D-Cit. Toisaalta osoittavat sekä SB-075 että SB-088 suurempaa tehokkuutta ja parempaa vesiliukoisuutta kuin SB-030.

35 Havainnot ja kokeet, jotka tehtiin SB-030:n, SB-075:n ja SB-088:n synteessin aikana, voidaan esittää lyhyesti seuraavasti:

Kuvataan SB-030:n, SB-075:n ja SB-088:n kiinteä-
faasisynteesi bentshydryyliamiinihartsin yhteydessä käyt-
tään Boc-toimintaohjetta. Tämä menettely on täysin riit-
tävä tämän peptidin kokoamista varten, koska se sisältää
5 asteittaisen ketjunpidentämisen karboksyylipään kautta,
jotta vältettäisiin merkittävä rasemoituminen amidisidok-
sen muodostamisen aikana, ja samoin siihen sisältyy väli-
tuotteiden helppo eristäminen, jotka välituotteet voivat
osoittautua erikoisen vaikeiksi syntetisoitaessa luon-
10 teeltaan hydrofiilisiä fragmentteja (toisin sanoen frag-
mentteja 9 - 10 - 5 - 10).

Tavanomainen asteittainen synteesi liuoksessa on
luonnollisesti myös sopiva näiden peptidien valmistusme-
netelmä, mutta se menetelmä vaatii kuitenkin varmasti
15 enemmän työtä ja aikaa.

Lähtöaineet

Kiinteä kantaja

Käytettiin bentshydryyliamiinihartsia, joka sisäl-
si 1,1 mekv. NH_2/g (Advanced ChemTech, Louisville, KY).
20 Voidaan myös käyttää pienemmän NH_2 -pitoisuuden, esim.
0,4 - 0,6 mekv./g, omaavia hartseja, mutta niiden käyttö
on luonnollisesti epätaloudellisempaa.

Aminojohdannaiset

Alla mainitut Boc-aminohapot hankittiin toimini-
25 meltä Bachem ja käytettiin ilman lisäpuhdistusta:

Boc-D-Ala, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu. H_2O ,

Boc-D-Nal, Boc-D-Phe(4Cl), Boc-Pro,

Boc-Ser(Bzl), Boc-D-Trp ja Boc-Tyr(DCB).

Boc-D-Cit, Boc-D-Hci ja Boc-D-Pal, joita ei ole
30 kaupallisesti saatavissa, valmistettiin kirjallisuuden
mukaan (1 - 4), vähäisin muutoksin.

Boc-D-Cit

Vaihe 1, D-Cit

D-Orn (Sigma, 98 %) muutettiin D-Cit:ksi kuten on
35 kuvattu (1), sillä poikkeuksella, että reaktioseosta,

jossa oli (D-Orn)₂Cu ja KOCN, sekoitettiin 2 - 3 tunnin ajan, jotta esitettäisiin (D-Cit, D-Orn)Cu:n muodostaman karstan kerrostuminen astian seinämiin.

5 D-Cit:n puhtaus tutkittiin TLE:n (ohutkerroselektroforeesi) avulla käyttäen pH-arvon 6,5 omaava pyridiini-etikkahappo-vesi (100:4:900) -puskuriliuosta ja 30 V/cm, 45 minuutin aikana.

Vaihe 2, Boc-D-Cit

10 6,6 g (30 mmoolia) Boc₂O, joka oli 15 ml:ssa asetonitriiliä, lisättiin liuokseen, jossa oli 4,4 g (25 mmoolia) D-Cit 25 ml:ssa vettä ja 12,6 ml:ssa (90 mmoolia) trietyyliamiinia. Seosta sekoitettiin 2 - 3 tunnin ajan. Sen jälkeen seokselle suoritettiin TLC (ohutkerroskromatografia) käyttäen liuotinsysteemiä etyyliasetaatit-pyridiini-etikkahappo-vesi (60:10:3:6): yhdisteillä Boc-D-Cit, D-Cit ja Boc-D-Orn (Boc), joka muodostui D-Orn-epäpuhtaudesta, ilmenevät vastaavasti R_f-arvot 0,4, 0,0 ja 0,9. Seosta laimennettiin 25 ml:lla vettä ja uutettiin dietyylieetterillä (2 x 20 ml) ja etyyliasetaatilla (2 x 20 ml), jotta poistettaisiin ylimäärä di-
20 karbonaattia ja Boc-D-Orn(Boc)-epäpuhtaus. Vesifaasi tehtiin happamaksi käyttäen 1 M KHSO₄ ja sen jälkeen kun oli lisätty suunnilleen 10 g Na₂SO₄ uutettiin faasia etyyliasetaatilla (3 x 30 ml). Yhdistetyt etyyliasetaattiliuokset (jotka oli huolellisesti erotettu vesikerroksesta)
25 haihdutettiin tyhjössä. Jäännös laimennettiin kuivalla dioksaanilla ja haihdutettiin tyhjössä kolme kertaa. Tämän seurauksena muodostunut kevyt öljy laimennettiin 25 ml:lla DMF ja käytettiin kytkemiseen pitoisuutena
30 mmooli/ml tätä Boc-D-Cit-perusliuosta.

Boc-Cit:n synteesi käyttäen Boc-atsidia asylointiaineena ja kiteisen disykloheksyyliamiinisuolan valmistus on kuvattu (2).

Boc-D-Hci

Vaihe 1, D-Hci

D-Hci valmistettiin yhdisteestä D-Lys.HCl (Sigma) vastaavasti kuin D-Cit (katso yllä ja viittaus 1).

5 Vaihe 2, Boc-D-Hci

6,6 g di-tert-butylikarbonaattia laimennettuna 15 ml:lla asetonitriiliä lisättiin liuokseen, jossa oli 25 mmoolia (4,73 g) D-Hci 25 ml:ssa vettä ja 12,6 ml:ssa (90 mmoolia) trietyyliamiinia, ja reaktioseosta sekoitettiin 2 - 3 tunnin ajan. Reaktion täydellisyys tutkittiin 10 TLC:n avulla kuten Boc-D-Cit:n tapauksessa; Boc-D-Hci:n, D-Lys:n ja Boc-D-Lys(Boc):n R_f-arvot olivat vastaavasti 0,3, 0,0 ja 0,8. Reaktioseosta uutettiin eetterillä. Vetsifaasi tehtiin happamaksi käyttäen 1 M KHSO₄ ja sen jälkeen kun oli lisätty 10 g Na₂SO₄, sitä uutettiin etyyli- 15 asetaatin ja n-butanolin 1:1-seoksella (4 x 30 ml). Yhdistetyt orgaaniset liuokset kuivattiin Na₂SO₄:n avulla ja haihdutettiin tyhjöissä. Jäännöstä hierrettiin dietylieetterin kanssa, suodatettiin, pestiin eetterillä, sitten suspendoitiin etyyliasetaattiin ja sekoitettiin 2 20 tunnin ajan 20 °C:ssa ja lisäksi 0 °C:ssa vielä 2 tunnin ajan. Näin saatu kiteinen materiaali suodatettiin erilleen, pestiin kylmällä etyyliasetaatilla ja kuivattiin, jolloin saatiin suunnilleen 3,9 g Boc-D-Hci:a, jonka sulamispiste oli 141 - 142 °C (hajoaa). 25

Boc-D-Pal(3)

Vaihe 1, dietyliasetamido(3-pyridyylimetyyli) malonaatti (3)

Saatiin 113,0 g (60,3 %) dietyliasetamido(3-pyridyylimetyyli)malonaattia 132,0 g:sta dietyliasetamidomalonaattia J.E. Rivierin et al. (3) menetelmän avulla. Raaka materiaali sulii 95 °C:ssa. Pieni näyte 104 - 106 °C:ssa sulaneesta (kirjallisuuden mukaan 95 °C) uudelleenkiteytettiin vedestä.

35 Vaihe 2, N-asetyyli-3-(3-pyridyyli)-DL-alaniinin etyyliesteri (4)

61,6 g (200 mmoolia) dietyyliasetamido(3-pyridyyli)malonaattia laimennettiin tulpalla varustetussa pullossa 210 ml:lla NaOH:n etanoliliuosta ja seisotettiin yön ajan ympäristön lämpötilassa. Seuraavana päivänä seos
 5 saatettiin palautusjäähdytysolosuhteisiin ja sitä pidettiin jäähdytyspalautuslämpötilassa 30 minuutin ajan. Seos jäähdytettiin sitten huoneen lämpötilaan ja suodatettiin liukenemattomien kiinteiden aineiden poistamiseksi. Liukenemattomia aineita pestiin erilaisilla pienillä määrillä etanolia ja heitettiin sitten pois. Yhdistetyt suodokset haihdutettiin kuiviin ja kuiva jäännös kiteytettiin vedestä käyttäen 3 - 5 ml H₂O:tä grammaa kohden kiinteää ainetta. Materiaalin saanto 38,0 (160 mmoolia, 80 %). Sulamispiste 124 - 126 °C (kirjallisuuden mukaan 118 -
 10 121 °C).

Vaihe 3, N-asetyyli-3-(3-pyridyyli)-D-alaniinin etyyliesteri (3)

45,0 g (190 mmoolia) yllä kuvattua DL-seosta laimennettiin 225 ml:lla kuumaa 4,5 % HCl. Tämä liuos jäähdytettiin sitten nopeasti 25 °C:een hienojen kiteiden suspension muodostamiseksi. pH-arvo säädettiin 7,2:ksi käyttämällä 2 N KOH:a ja sitten lisättiin 150 mg alfa-kymotrypsiiniä ja pH-arvo pidettiin sitten välillä 6,8 - 7,2 lisäämällä tipoitain 2 N KOH:a. Sen jälkeen kun pH-arvossa ei ollut tapahtunut muutosta 15 minuutin aikana, lisättiin vielä 50 mg alfa-kymotrypsiiniä, jotta varmistettaisiin, että hydrolyysi oli tapahtunut täydellisesti. pH-arvossa ei ilmennyt enää muutosta tämän uuden entsyymilisäyksen jälkeen ja lopullinen pH-arvo oli 7,2. Tätä liuosta uutettiin 4 x 200 ml:lla etyyliasetaatia. Etyyliasetaatiiuutteet yhdistettiin, kuivattiin Na₂SO₄:n avulla, kuivausaine suodatettiin pois ja liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös uudelleenkiteytettiin tolueenista (13 15 ml/g), jolloin saatiin saannoksi 13,0 g (55 mmoolia, 57 %), tuotetta, jonka sulamispiste oli 79 - 81 °C (kirjallisuuden mukaan 122 °C).
 20
 25
 30
 35

Vaihe 4, 3-(3-pyridyyli)-D-alaniini, D-Pal(3) (4)
13,0 g (55 mmoolia) N-asetyyli-3-(3-pyridyyli)-D-alaniinin etyyliesteriä kuumennettiin yön ajan 100 ml:n kanssa 6 N HCl:a palautusjäähdyttäen. Liuotin poistettiin
5 tyhjössä. Lisättiin 15 mg etanolia ja tämä poistettiin tyhjössä. Tämä etanolikäsittely toistettiin vielä kaksi kertaa. Jäännös uudelleenkiteytettiin 90 % etanolista, jolloin saatiin 13,0 g (54 mmoolia, 98 %) amiinihydrokloridia. Sulamispiste 237 - 239 °C (hajoaa) (kirjallisuuden
10 mukaan 253 - 256 °C).

Vaihe 5, N-Boc-3-(3-pyridyyli)-D-alaniini, Boc-D-Pal(3) (3)
13,0 g (54 mmoolia) yllä kuvattua D-Pal(3):a laimennettiin 50 ml:lla H₂O:tä. Lisättiin 50 ml tetrahydrofuraania ja 30 ml (214 mmoolia) trietyyliamiinia. Tähän seokseen lisättiin sekoittamisen aikana tunnin väliajoin
15 4 x 5 g:n osia Boc₂O (90,7 mmoolia). Sen jälkeen kun oli sekoitettu kaikkiaan 6 tunnin ajan, poistettiin tetrahydrofuraani tyhjössä. Ylimäärä dikarbonaattia poistettiin
20 heksaanin avulla. Vesikerroksen pH-arvo säädettiin 6 N HCl:n avulla 4:ksi ja sitä uutettiin sitten 4 x 100 ml:n osilla etyyliasetaattia. Etyyliasetaattiuutteet yhdistettiin ja takaisin uutettiin 2 x 5 ml:n osilla kyllästettyä suolaliuosta. Kuivattiin Na₂SO₄:n avulla, suodatettiin ja
25 liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös uudelleenkiteytettiin tolueenista, jolloin saatiin 8,4 g (31 mmoolia, 57 %) Boc-D-Pal(3):a, jonka sulamispiste oli 141 - 142 °C (hajoaa) (kirjallisuuden mukaan 135 - 136 °C).

Peptidihartsien valmistus

30 Manuaaliseen synteisiin tarkoitettuun reaktioastiaan, jonka vetävyys oli suunnilleen 60 ml; pantiin 1 g (1,1 mmoolia) bentshydryyliamiini HCl-hartsia. Annettiin paisua 2 tunnin ajan 20 ml:ssa DCM:a ja suodatettiin sitten. Sen jälkeen lisättiin hartsin joukkoon 15 ml 10 %
35 DIEA/DCM:a, ravistettiin 2 minuutin ajan ja suodatettiin.

Viimeksi mainittu käsittely toistettiin vielä kaksi kertaa. Boc-aminohapot liitettiin etukäteen muodostettuina HOBt-estereinä tähän hartsiin vähitelleen kuten on esitetty taulukossa 3. Vaiheet 1 - 12 muodostavat yhden aminohappojäännöksen kytkentäsyklin. Kymmenen peräkkäisen syklin avulla saatiin vapaan D-Nal(2)-jäännöksen päättämä dekaeptidiamidiharts. Tämä peptidiharts asetuloitiin kuten on kuvattu vaiheissa 2e ja 2f, poistettiin sitten reaktioastiasta, pestiin DCM:lla ja n-heksaanilla ja kuivatettiin tyhjiössä, jolloin saatiin 2,9 - 3,0 g haluttua seuraavien rakenteiden mukaista asetyylidekaeptidiamidihartsia²:

1. Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(DCB)-D-Cit-Leu-Arg(Tos)-Pro-D-Ala-NH-HARTSI SB-030:n tapauksessa;

2. Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser(Bzl)-Tyr(DCB)-D-Cit-Leu-Arg(Tos)-Pro-D-Ala-NH-HARTSI SB-075:n tapauksessa;

3. Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser(Bzl)-Tyr(DCB)-D-Hci-Leu-Arg(Tos)-Pro-D-Ala-NH-HARTSI SB-088:n tapauksessa.

²SB-088:a syntetisoitiin pienempi määrä (0,1866 mmoolia), peptidihartsia no. 3 ja saadun vapaan dekaeptidin raakaa HF-suolaa oli vastaavasti 410 mg ja 200 mg.

Taulukko 4. Synteesiohjelma

5	Vaihe	Reagenssi ja menetelmä	Sekoitus aika minuutteina
	1	etukäteen valmistettu HOBt-esteri ³ , kytkentä	90
10	2	ninhydriinikoe (5) ⁴ , kun palloset ovat keskinkertaisen tai voimakkaan sinisiä, toistetaan vaiheet 1 + 2, heikosti si- nisen värin tapauksessa jatketaan vai- heilla 2a - 2f	
15	2a	MeOH (10 ml), pesu	1
	2b	10 % DIEA/DCM (10 ml), neutralointi	2
	2c	MeOH (10 ml), pesu	1
	2d	DCM (10 ml), (kolme kertaa) pesu	2
	2e	asetyyli-imidatsoli ⁴ , asetylointi	30
20	2f	ninhydriinikoe, jos se on positiivi- nen, toistetaan vaiheet 2d - 2f	
	3	MeOH (10 ml), (kaksi kertaa) pesu	1
	4	DCM (10 ml), (kolme kertaa) pesu	2
	5	50 % TFA/DM (10 ml), suojaryhmän poisto	1
25	6	50 % TFA/DM (10 ml), suojaryhmän poisto	30
	7	IpOH (10 ml), pesu	1
	8	10 % DIEA/DCM (10 ml), neutralointi	3
	9	MeOH (10 ml), pesu	1
30	10	10 % DIEA/DCM (10 ml), neutralointi	3
	11	MeOH (10 ml), pesu	1
	12	DCM (10 ml), pesu	2

35

³Lukuunottamatta yhdistettä Boc-D-Cit valmistet-
tiin Boc-aminohappojen HOBt-esterit seuraavasti:

3 mmol Boc-aminohappoa [toisin sanoen (mg:na)
 D-Ala: 568, D-Pro: 646, Arg(Tos): 1 286, Leu: 748,
 Tyr(DCB): 1 321, Ser(Bzl): 886, D-Hci: 865, D-Trp: 913 tai
 D-Pal(3): 799, D-Phe(4Cl): 899, D-Nal(2): 946⁷ ja 460 mg
 5 (3 mmol) HOBt.H₂O:ta liuotettiin 1 ml:an DMF:a, laimen-
 nettiin 2 ml:lla DCM:a, jäädytettiin 0 °C:een ja annet-
 tiin reagoida 0,6 ml:n (3,8 mmol) kanssa DIC:a 0 °C:ssa
 10 10 minuutin ajan; sen jälkeen lisättiin hartsiin huuhtel-
 len 4 x 1 ml:lla DCM:a. Boc-D-Cit:n tapauksessa liuotet-
 tiin HOBt.H₂O 3 ml:an Boc-D-Cit-perusliuosta, annettiin
 reagoida DIC:n kanssa kuten yllä, sitten sekoitettiin
 hartsin joukkoon käyttäen 1 x 1 ml DMF:a ja 3 x 1 ml:n
 DCM-huuhtelua.

⁴Cit:a sisältävien peptidihartsien tapauksessa on
 15 kokeen tulos negatiivinen, kun palloset ovat valkeita (tai
 heikosti keltaisia) ja liuos on värjäytynyt sinipunerta-
 vaksi. Boc-Arg(Tos):n täydellinen kiinnittyminen Pro-jään-
 nökseen, joka on liittynyt hartsiin, voidaan tarkistaa
 käyttämällä isatiinireagenssia (2,5 g isatiinia, 20 g fe-
 20 nolia, 30 g bentsyylialkoholia ja 2,5 g Boc-Phe:a); ko-
 keen tulos on negatiivinen, kun palloset ovat valkeita
 (tai heikosti keltaisia, mutta eivät sinisiä) sen jälkeen
 kun on pesty 3 - 4 kertaa asetonilla.

⁴0,34 g:n imidatsolia liuotettuna 2 ml:an DCM:a
 25 annettiin reagoida 0,5 ml:n kanssa etikkahapon anhydridiä
 0 °C:ssa 2 minuutin ajan ja lisättiin sitten hartsin
 joukkoon käyttäen 3 x 2 ml:n DCM-huuhtelua.

Vapaiden dekaeptidiamidien valmistus

Lohkaisu ja suojauksen poisto

30 Kutakin peptidihartsia käsiteltiin 3 ml:lla m-
 kresolia ja suunnilleen 30 ml:lla fluorivetyä (HF) 0
 °C:ssa 45 minuutin ajan. Sen jälkeen kun HF oli poistet-
 tu suurtyhjössä, hierrettiin jäljellä olevaa peptidihart-
 sia kuivan dietyylieetterin kanssa, suodatettiin, pes-
 35 tiin dietyylieetterillä ja peptidi uutettiin sitten seu-
 raavasti:

1. 50 % etikkahappo ja DMF (2 - 2 x 20 ml) SB-030:n tapauksessa;

2. 50 % etikkahappo (3 x 15 ml) SB-075:n ja SB-088:n tapauksessa;

5 ja erotettiin hartsista suodattamalla. Peptidiliuos haihdutettiin tyhjössä ja jäännöstä hierrettiin dietyylieetterin kanssa, suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin 1,2 - 1,3 g HF-suolaa raakojen dekapeptidien kanssa², puhtauden ollessa
10 70 - 85 %.

Puhdistus

Raaka peptidi puhdistettiin käyttämällä Beckman Prep-350 -preparatiivista HPLC-systeemiä. Erottumiset saatiin tapahtumaan 41,5 x 250 mm:n Dynamax-pylväässä,
15 jossa oli pakattuna pallomaista C₁₈-silikageeliä (huokoskoko 300 Å, osasten suuruus 12 µm) (RAININ Inc. Co. Woburn, MA).

Raaka SB-030 lisättiin pylvääseen 30 % muurahais-
happoliuoksessa, kun sen sijaan raaka SB-075 ja SB-088
20 liuotettiin 30 % etikkahappoon. Käytettiin painegradienttieluutiota. Liuotin A oli 0,1 % TFA:n vesiliuos ja liuot-
tin B oli 0,1 % TFA 70 % asetonitriilin vesiliuoksessa. Painevirtausnopeus oli 35 ml/min. Pylvään eluointia val-
vottiin vaihdeltavissa olevan aallonpituuden UV-detektorin avulla (Beckman tyyppi 163) 220 nm:n aallonpituudella.
25

Puhtaiden dekapeptidiamidien määrä ja yleensä saadut saannot olivat seuraavat:

1. 600 mg (34 %) SB-030:a,
- 30 2. 960 mg (52 %) SB-075:tä ja
3. 140 mg (45 %) SB-088:a (katso alaviite 2), jolloin puhtaus oli >95 %.

Analyttinen HPLC

HPLC-analyysi suoritettiin Hewlett-Packard malli
35 1090 -nestekromatografian avulla. Peptidinäytteet kromatografoitiin 4,6 x 250 mm:n W-Porex 5 µm - C₁₈-pylväässä

(Phenomex, Rancho Palos Verdes, CA) läpivirtausnopeudella 1,2 ml/min käyttäen painegradienttieluutiota liuottimilla A ja B (raakanäytteiden kromatogrammeja on liitetty mukaan).

5 Aminohappoanalyysi

Peptidinäytteitä hydrolysoitiin 110 °C:ssa 20 tunnin ajan tyhjennetyissä, suljetuissa putkissa käyttäen 4 M metaanisulfonihappoa, jossa oli 0,2 % 3-(2-aminoetyyli)-indolia, ja hydrolysaatin aminohappokoostumus määritettiin Beckman 6300 -aminohappoanalysaattorissa.

Oheisessa taulukossa on osoitettu LHRH-analogien affiniteetti aivolisäkerauhasta kohtaan tai ihmisen nisäsyöpämembraanin reseptoreita kohtaan, määritettynä käyttäen radioaktiivisuudella merkittyä LHRH:a tai radioaktiivisuudella merkittyä D-Trp⁶-LHRH:a.

Radioaktiivisuudella merkittyä LHRH:a käyttäen suoritettut mittaukset (A) osoittavat, että SB-075:llä ilmenee suurin affiniteetti aivolisäkerauhasen reseptoreita kohtaan, toisin sanoen sillä on suurin kyky syrjäyttää LHRH, mikä on LHRH:n antagonistien päätuntemerkki. Toisaalta näyttää SB-088 osoittavan erityisen suurta affiniteettia ihmisen nisäsyöpämembraanin reseptoreita kohtaan kummassakin kokeissa (A + B).

Kirjallisuusviitteet:

- 25 1. J.P. Greenstein ja M. Winitz: Chemistry of the Amino Acids, John Wiley + Sons, New York, NY, 1961. (Cit: 2 491 - 2 494).
2. K. Eisele: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 845 - 854 (1975).
- 30 3. J.E. Rivier, J. Porter, C.L. Rivier, M. Perrin, A. Corriogan, W.A. Hook, R.P. Siraganian ja W.W. Vale: J. Med. Chem. 29, 1 846 - 1 851 (1986).
4. C. Hoes, J. Raap, W. Bloemhoff ja K.E.T. Kerling: Recl. Trav. Chim. Pay-Bas 99, 99 - 104 (1980).
- 35 5. J.M. Stewart ja J.D. Young: Solid Phase Peptide Synthesis, toinen painos. Pierce Chemical Company, Rockford Illionois, 1984⁶.

Esimerkki 1

Kaavan Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ mukainen peptidi

Synteesi tapahtuu välipeptidistä Ac-D-Nal(2)-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.
 5 Tämä välipeptidi rakennettiin asteittain n. 0,6 mekv. NH₂/g sisältävään bentshydryyliamiinihartsiin kiinnit-
 tyneenä Beckman 990 -syntetisaattorissa aloittaen Boc-D-Ala:lla alla kuvatun menetelmän mukaan.

10 Kytkeminen suoritetaan ohjeen A mukaan seuraavasti:

Ohje A

Reagenssi	Sekoitus aika (minuutteja)
15 1. Boc-aminohappo (2 - 3 mmoolia/g hartsia) + ekviv. määrä DIC:ä	60 - 90
2. MeOH (kaksi kertaa)	1
3. CH ₂ Cl ₂ (kaksi kertaa)	1

20

Suojaryhmien poisto suoritetaan ohjeen B mukaan seuraavasti:

Ohje B

Reagenssi	Sekoitus aika (minuutteja)
4. 50 % TFA/1 % etaaniditioli CH ₂ Cl ₂ :ssa (kaksi kertaa)	15 + 15
5. IpOH/1 % etaaniditioli	1
30 6. 10 % TEA CH ₂ Cl ₂ :ssa	2
7. MeOH	1
8. 10 % TEA CH ₂ Cl ₂ :ssa	2
9. MeOH (kaksi kertaa)	1 + 1
10. CH ₂ Cl ₂ (kaksi kertaa)	1 + 1

35

Lyhyesti sanottuna käytetään Boc:ä α -aminoryhmien suojaamiseen. Tos:ä käytetään suojaamaan Arg:n guanidinoryhmää. DCB:ä käytetään Tyr:n fenolisen hydroksyyli-ryhmän suojaryhmänä ja Ser:n OH-ryhmä suojataan BzL:n avulla. Käytetään suojattujen aminohappojen kaksin- - kolminkertaista ylimäärää perustuen bentshydryyliamiinihartsin NH_2 -pitoisuuteen plus yhteen ekvivalenttiin DIC:ä CH_2Cl_2 CH_2Cl_2 :ssa tai 10 - 50 % DMF/ CH_2Cl_2 :ssa, kulloinkin Boc-aminohapon liukoisuuden mukaan, kahden tunnin ajan.

10 N-terminaalinen asetylointi suoritetaan käyttäen etikkahapon anhydridin 50-kertaista ylimäärää CH_2Cl_2 :ssa 0,5 tunnin aikana. Näin saadulla suojatulla välipeptidillä on seuraava kokoonpano:

15 Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser(X^4)-Tyr-(X^5)-D-Lys(X^6)-Leu-Arg(X^8)-Pro-D-Ala-NH- X^{10} , missä X^4 on Bzl ja X^5 on DCB, X^6 on Z(2-Cl), X^8 on Tos ja X^{10} on hartsiin kuuluva bentshydryyliryhmä.

Suojatun peptidihartsin pilkkomiseksi ja suojauksen poistamiseksi siitä sitä käsitellään 1,4 ml:lla m-kresolia ja 15 ml:lla fluorivetyä grammaa kohden peptidihartsia 0,5 tunnin ajan 0 °C:ssa ja 0,5 tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Sen jälkeen kun fluorivety on poistettu suurtyhjössä peptidihartsi pestään dietyylieetterillä ja peptidi uutetaan sitten DMF:lla ja erotetaan hartsista suodattamalla. DMF-liuos konsentroidaan sitten suurtyhjössä pieneen tilavuuteen ja sitä hierretään sitten dietyylieetterin kanssa. Näin saatu raakatuote puhdistetaan yllä kuvatulla tavalla valmistavan HPLC:n avulla. Näin saadaan yllä annetun kaavan mukainen puhdas vapaa välipeptidi, jossa X^4 , X^5 , X^6 , X^8 ja X^{10} merkitsevät vetyä.

30 Vapaan, D-Lys(X^6):n sisältävän välipeptidin annetaan sitten reagoida huoneen lämpötilassa kaliumsyanaatin kanssa 80 % DMF:n vesiliuoksessa (81 mg KCNO/ml; aika: 24 tuntia). Sen jälkeen kun liuotin on poistettu suurtyhjössä seuraa reaktiotuotteen puhdistus preparatiivisen HPLC:n avulla; näin saadaan haluttu D-Hci:n sisältävä peptidi.

Näin saatu D-Hci:n sisältävä peptidi on oleellisesti puhdas (95 %:iin saakka). HPLC-analyysi suoritetaan Hewlett-Packard 1090A -gradienttimestekromatografiasysteemissä PHENOMENEX (W-Porex 5C18) -pylväässä ja eluoidaan 5 liuottimilla, joista A on: 0,1 % TFA, B: 0,1 % TFA 70 % CH₃CN:ssa, käyttäen gradienttia 30 - 60 % 30 minuutissa. Halutulla peptidillä ilmenee HPLC-retentioaika (retention time) 28,2 minuuttia.

Peptidien puhdistaminen suoritetaan Beckman Prep-10 350-gradienttimestekromatografissa käyttäen 41,4 x 250 mm:n kolonnia, jossa on preparatiivinen, käänteinen DYNEMAX C18 -faasi (300 Å, 12 µm), ja liuottimia, joista A on: 0,1 % TFA ja B: 0,1 % TFA 70 % CH₃CN:ssa, ja käyttäen painegradienttia 45 - 60 % 30 minuutissa. Puhdas peptidi, 15 joka on saatu TFA-suolan muodossa, voidaan haluttaessa muuttaa asetaattimuotoon, nimittäin saattaen asetaattimuotoon johtamalla AG3X (Bio-Rad) -pylvään lävitse ja sen jälkeen lyofilisoiden.

Esimerkki II

20 Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(etyyli)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Valmistaminen tapahtuu vastaavasta välipeptidistä, joka sisältää 6-asemassa D-Hci(etyyli):n asemesta aminohapon D-Lys, vastaavalla tavalla kuin esimerkissä 25 I antamalla reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa (0,1 mg 10 ml:ssa 1 g:a kohden välipeptidiä) DMF:ssa 0 - 10 °C:ssa 10 tunnin aikana. Retentioaika (retention time) on 30,8 minuuttia.

Esimerkki III

30 Peptidin Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ synteesi suoritetaan esimerkissä I kuvatulla tavalla. Lähtöpeptidi sisältää 6-asemassa Boc-D-Orn(Z):n Boc-D-Lys[Z(2-Cl)]₇:n asemesta, jota käytetään esimerkissä I. Tämä lähtöpeptidi valmistetaan 35 vastaavasti kuin esimerkissä I. Retentioaika 27,8 minuuttia. Lähtöpeptidin retentioaika 25,5 minuuttia.

Esimerkki IV

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(etyyli)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- Tämä peptidi valmistetaan Ac-D-Nal(2)-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂:sta ja N-etyyli-isosyanaatista DMF:ssa (0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden välipeptidiä) 0 - 10 °C:ssa esimerkin III mukaisesti. Reaktioaika 10 tuntia. HPLC-retentioaika 30,4 minuuttia.

Esimerkki V

- 10 Peptidin Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ synteesi suoritetaan esimerkissä I kuvatulla tavalla, sillä poikkeuksella, että lähtöpeptidin 1-asemaan sijoitetaan Boc-D-Phe(4-Cl) Boc-D-Nal(2):n asemesta, jolloin saadaan välittömänä lähtöpeptidinä Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂. Retentioaika 26,6 minuuttia; lähtöpeptidin, jossa on Ac 1-asemassa, retentioaika: 24,0 minuuttia.

Esimerkki VI

- 20 Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(etyyli)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- Lähtöpeptidi on Ac-D-Phe(4-Cl)-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (katso esimerkki V), jonka annetaan reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa (0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden lähtöpeptidiä) 0 - 10 °C:ssa DMF:ssa. Reaktioaika 10 tuntia. HPLC-retentioaika: 29,2 minuuttia.

Esimerkki VII

- 30 Peptidin Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ synteesi suoritetaan kuten on kuvattu esimerkissä I, sillä poikkeuksella, että Boc-D-Phe(4-Cl) sijoitetaan Boc-D-Nal(2):n asemesta 1-asemaan ja Boc-D-Orn(Z) Boc-D-Lys[$\bar{Z}$ (2-Cl)]₇:n asemesta 6-asemaan, niin että välittömänä lähtöpeptidinä saadaan Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (retentioaika 24,0 minuuttia), jonka annetaan

sitten reagoida esimerkin I mukaisesti KCNO:n kanssa.
HPLC-retentioaika 26,3 minuuttia.

Esimerkki VIII

5 Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-(etyyli)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Lähtöpeptidi on Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (katso esimerkki VII), jonka annetaan reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa DMF:ssa (0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden lähtöpeptidiä) 10 0 - 10 °C:ssa 10 tunnin ajan. HPLC-retentioaika 28,6 minuuttia.

Esimerkki IX

15 Peptidin Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ synteesi suoritetaan esimerkin I mukaisesti. Saadulla peptidillä ilmenee HPLC-retentioaika 27,4 minuuttia.

Esimerkki X

20 Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(etyyli)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂
Lähtöpeptidi on: Ac-D-Nal(2)-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (katso esimerkki IX), jonka annetaan reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa DMF:ssa (0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden lähtöpeptidiä) 0 - 10 °C:ssa 10 tunnin ajan. HPLC-retentioaika 30,0 minuuttia.

25 Esimerkki XI

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

30 Lähtöpeptidi on: Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (retentioaika 16,8 minuuttia), jonka annetaan reagoida esimerkin I mukaisesti kaliumsyanaatin kanssa. Lähtöpeptidi saadaan vastaavasti kuin esimerkissä I, sillä poikkeuksella, että Boc-Pro sijoitetaan Boc-D-Nal(2):n asemesta 1-asemaan. HPLC-retentioaika 19,3 minuuttia.

Esimerkki XII

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(etyyli)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- 5 Lähtöpeptidi on: Ac-D-Pro-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (katso esimerkki XI), jonka annetaan reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa DMF:ssa (0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden lähtöpeptidiä) 0 - 10 °C:ssa 10 tunnin ajan. HPLC-retentioaika 22 minuuttia.

Esimerkki XIII

- 10 Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- 15 Lähtöpeptidi on: Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (retentioaika 16,85 minuuttia), jonka annetaan esimerkin I mukaisesti reagoida kaliumsyanaatin kanssa. Lähtöpeptidi saadaan myös vastaavasti kuin esimerkissä I, sillä erotuksella, että Boc-Pro sijoitetaan Boc-D-Nal(2):n asemesta 1-asemaan ja Boc-D-Orn(Z) Boc-D-Lys/ $\bar{Z}$ (2-Cl) $\bar{Z}$:n asemesta 6-asemaan. HPLC-retentioaika 18,8 minuuttia.

- 20 Esimerkki XIV

Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(etyyli)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- 25 Lähtöpeptidi on: Ac-Pro-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (katso esimerkki XIII), jonka annetaan esimerkin VI mukaisesti reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa. HPLC-retentioaika 24,9 minuuttia.

Esimerkki XV

Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- 30 Lähtöpeptidi on: Ac-D-Phe-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (retentioaika 20,8 minuuttia), jonka annetaan esimerkin I mukaisesti reagoida kaliumsyanaatin kanssa. Lähtöpeptidi saadaan vastaavasti kuin esimerkissä I, jolloin kuitenkin 1-asemaan sijoitetaan Boc-D-Nal(2):n asemesta aminohappojäännös Boc-D-Phe. HPLC-retentioaika 23,4 minuuttia.
- 35

Esimerkki XVI

Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci(etyyli)-
Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- Lähtöpeptidi on: Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-
5 Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (katso esimerkki XV), jon-
ka annetaan reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa DMF:ssa
(0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden lähtöpeptidiä) 0 - 10
°C:ssa 10 tunnin ajan. HPLC-retentioaika 26,0 minuuttia.

Esimerkki XVII

- 10 Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-
Pro-D-Ala-NH₂

- Lähtöpeptidi on: Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-
Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (retentioaika 21,0 minuut-
tia), jonka annetaan esimerkin I mukaisesti reagoida ka-
15 liumsyanaatin kanssa. Lähtöpeptidin valmistus tapahtuu
esimerkin I mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-
Nal(2):n asemesta sijoitetaan 1-asemaan Boc-D-Phe ja Boc-
D-Lys[$\bar{Z}$ (2-Cl)]₇:n asemesta 6-asemaan Boc-D-Orn(Z). HPLC-
retentioaika 23,1 minuuttia.

- 20 Esimerkki XVIII

Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit(etyyli)-
Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- Lähtöpeptidi on: Ac-D-Phe-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-
Tyr-D-Orn-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ (katso esimerkki XVII),
25 jonka annetaan reagoida N-etyyli-isosyanaatin kanssa
DMF:ssa (0,1 mg 10 ml:ssa grammaa kohden lähtöpeptidiä)
0 - 10 °C:ssa 10 tunnin ajan. HPLC-retentioaika 25,4 mi-
nuuttia.

Esimerkki XIX

- 30 Esimerkki kaavan Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-
Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ mukaisen peptidin
yleisestä valmistuksesta.

- Tämä peptidi valmistetaan asteittain käyttäen
bentshydriyliamiinihartsia, joka sisältää suunnilleen
35 1,0 moolia ekvivalenttisia aminoryhmiä grammaa kohden,
käyttäen Beckman 990 -syntetisaattoria, jolloin aloite-

taan Boc-D-Alasta. Kytkeminen tapahtuu esimerkissä I annetun ohjeen A mukaan. D-suojaryhmän poistaminen suoritetaan esimerkissä I annetun ohjeen B mukaan. Muut olosuhteet ovat vastaavien esimerkissä I annettujen tietojen mukaiset.

Näin saatu suojattu välipeptidi on kokoonpanoltaan seuraavanlainen:

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser(X^4)-Tyr(X^5)-D-Hci-Leu-Arg(X^8)-Pro-D-Ala-NHX¹⁰, jolloin X^4 = Bzl ja X^5 = Bzb, X^8 = Tos ja X^{10} on bentshydryyliryhmä, joka kuuluu hartsiin.

Näin saadun suojatun peptidin lohkaistu tapahtuu esimerkin I mukaan käyttäen 1,4 ml m-kresolia ja 15 ml fluorivetyä grammaa kohden peptidihartsia (0,5 tuntia 0 °C:ssa ja 0,5 tuntia huoneen lämpötilassa). Kaikki muut toimenpiteet ovat esimerkissä I ilmoitetun mukaiset. Saatua raakatuote puhdistetaan preparatiivisen HPLC-kromatografian avulla. HPLC-analyysi suoritetaan esimerkin I mukaisesti Hewlett-Packard 1090A -gradienttinestekromatografiasysteemissä käyttäen Phenomenex-pylvästä ja eluoiden seuraavilla liuottimilla:

Liuotin A: 0,1 % TFA, liuotin B: 0,1 % TFA 70 % CH₃CN:ssa käyttäen gradienttia 35 - 75 % 30 minuutissa. Saatun peptidin, jossa on 6-asemassa D-Hci, HPLC-retentioaika on 22,9 minuuttia. Lisäpuhdistus tapahtuu Beckmann-Prep-350-gradientti-nestekromatografissa esimerkin I mukaisesti.

Esimerkki XX

Peptidi H₂N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ saadaan esimerkin XIX mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-Nal(2):n asemasta si-
joitetaan 1-asemaan H₂N-CO-D-Nal(2) ja N-terminaalista asylointia ei suoriteta. HPLC-retentioaika 24,0 minuuttia.

Esimerkki XXI

Peptidin Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ synteesi tapahtuu kuten on ku-

vattu esimerkissä XIX sillä poikkeuksella, että Boc-D-Cit sijoitetaan asemaan 6 Boc-D-Hci:n asemesta. Halutulla peptidillä on HPLC-retentioaika 22,5 minuuttia.

Esimerkki XXII

- 5 Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Valmistus esimerkin XIX mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-Phe(4-Cl) sijoitetaan 1-asemaan Boc-D-Nal(2):n asemesta. HPLC-retentioaika 24,0 minuuttia.

- 10 Esimerkki XXIII

Ac-D-Phe(4-Cl)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- Valmistus tapahtuu esimerkin XIX mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-Phe(4-Cl) sijoitetaan Boc-D-Nal(2):n asemesta 1-asemaan ja Boc-D-Cit Boc-D-Hci:n asemesta 6-asemaan. Saadun peptidin retentioaika on 20,8 minuuttia.

Esimerkki XXIV

- 20 Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Valmistus tapahtuu esimerkin XIX mukaisesti, sillä erotuksella, että Boc-Gly sijoitetaan 10-asemaan Boc-D-Ala:n asemesta. Saadun peptidin HPLC-retentioaika on 22,4 minuuttia.

- 25 Esimerkki XXV

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- Valmistus tapahtuu esimerkin XIX mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-Pal(3) sijoitetaan Boc-D-Trp:n asemesta 3-asemaan. Saadun peptidin HPLC-retentioaika on 13,6 minuuttia.

Esimerkki XXVI

Ac-D-Nal-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

- 35 Valmistus tapahtuu esimerkin XIX mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-Cit sijoitetaan D-Hci:n asemesta

6-asemaan ja Boc-D-Pal(3) Boc-D-Trp:n asemesta 3-asemaan. Saadun peptidin HPLC-retentioaika on 13,3 minuuttia.

Esimerkki XXVII

Peptidin $H_2N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-$
 5 $Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2$ synteesi suoritetaan kuten on kuvattu esimerkissä XIX, sillä erotuksella, että Boc-D-Cit sijoitetaan Boc-D-Hci:n asemesta asemaan 6, Boc-D-Pal(3) sijoitetaan Boc-D-Trp:n asemesta asemaan 3 ja N-terminaalinen asetylointi jätetään pois. Näin saadaan
 10 välipeptidi: $H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2$. Näin saadun vapaan peptidin annetaan sitten reagoida kaliumsyanaatin kanssa 80 % DMF:n vesiliuoksessa (81 mg KOCN/300 mg peptidiä/ml) huoneen lämpötilassa 24 tunnin ajan. Sen jälkeen kun on haihdutet-
 15 tu suurtyhjössä, reaktioseos puhdistetaan preparatiivisen HPLC:n avulla. Näin saadun peptidin HPLC-retentioaika on 14,4 minuuttia.

Esimerkki XXVIII

$H_2N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-$
 20 $Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2$ valmistetaan esimerkin XIX mukaisesti sillä erotuksella, että Boc-D-Pal(3) sijoitetaan Boc-D-Trp:n asemesta asemaan 3 ja että N-terminaalinen asetylointi jätetään pois. Näin saadaan välipeptidi $H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2$.
 25 Näin saadun vapaan peptidin annetaan sitten reagoida kaliumsyanaatin kanssa DMF:n vesiliuoksessa (81 mg KOCN/300 mg peptidiä/ml) huoneen lämpötilassa 24 tunnin ajan. Sen jälkeen kun on haihdutettu suurtyhjössä, reaktioseos puhdistetaan preparatiivisen HPLC:n avulla. Näin saadun pep-
 30 tidin HPLC-retentioaika on 14,7 minuuttia.

Esimerkki XXIX

Peptidin $H_2N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-$
 $Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-AlaNH_2$ synteesi alkaa välipeptidin $H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-$
 35 $Pro-D-Ala-NH_2$ valmistamisesta. Välipeptidin synteesi suoritetaan kuten on kuvattu esimerkissä XIX, sillä erotuk-

- sella, että Boc-D-Orn(Z) sijoitetaan asemaan 6 Boc-D-Hci:n asemesta ja että N-terminaalinen asetylointi jätetään pois. Vapaan, 6-asemassa D-Orn:n sisältävän peptidin annetaan sitten reagoida kaliumsyanaatin kanssa 80 %
- 5 DMF:n vesiliuoksessa (162 mg KOCN/300 mg peptidiä/ml) huoneen lämpötilassa 24 tunnin ajan. Sen jälkeen on haihdutettu suurtyhjössä, reaktioseos puhdistetaan preparatiivisen HPLC:n avulla. Näin saadun peptidin HPLC-retentioaika on 23,6 minuuttia.
- 10 Esimerkki XXX
- Peptidin $H_2N-CO-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2$ synteesi alkaa välipeptidin $H-D-Nal(2)-D-Phe(4-Cl)-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2$ valmistamisella. Välipeptidin synteesi suoritetaan kuten on kuvattu esimerkissä XIX, sillä erotuksella, että Boc-D-Lys/ $\bar{Z}(2-Cl)$ sijoitetaan 6-asemaan Boc-D-Hci:n asemesta ja että N-terminaalinen asetylointi jätetään pois. Vapaan peptidin, joka sisältää 6-asemassa D-Lys:n, annetaan sitten reagoida kaliumsyanaatin kanssa
- 20 80 % DMF:n vesiliuoksessa (164 mg KOCN/300 mg peptidiä/ml) huoneen lämpötilassa 24 tunnin ajan. Sen jälkeen kun on haihdutettu suurtyhjössä, reaktioseos puhdistetaan preparatiivisen HPLC:n avulla. Näin saadun peptidin HPLC-retentioaika on 14,0 minuuttia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen pep-
 5 tidin valmistamiseksi, jolla on kaava



jossa

10 X on asyylliryhmä, joka on saatu 1 - 7 hiiliatomia sisältävien, alifaattisten tai alisyklisten karboksyylihappojen suorista tai haarautuneista ketjuista, tai karbamoyyliryhmä,

R¹ on D- tai L-Pro, D- tai L-Δ³-Pro, D-Phe,
 15 D-Phe(4-Hl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) tai D-Nal(2),

R² on D-Phe tai D-Phe(4-Hl),

R³ on D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) tai
 D-Nal(2),

R⁶ on D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) tai D-Hci(Q) ja

20 R¹⁰ on Gly tai D-Ala,

jolloin Hl on fluori, kloori tai bromi ja Q on C₁₋₃-alkyyli, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditiosuolojen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

peptidikemiassa tavallisen fragmenttikondensaation
 25 avulla kondensoidaan vastaavat peptidifragmentit tai peptidi rakennetaan asteittain lähtöaminohapoista peptidikemiassa tavallisen fragmenttikondensaation avulla tai

kaavan I mukaisessa peptidissä, jossa R⁶ on D-Orn tai D-Lys, D-Orn:n tai D-Lys:n vapaa aminoryhmä muutetaan
 30 saattamalla reagoimaan alkalisyanaatin kanssa tai yhdisteen kanssa, joka tuottaa syanaatin, tai C₁₋₃-alkyyli-iso-syanaatin kanssa ureidoryhmäksi ja

saadut peptidit mahdollisesti asyloidaan ja/tai
 35 muutetaan amideiksi ja

mahdollisesti muutetaan fysiologisesti vaarattomiksi happosuoloiksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että suoritetaan asteittainen rakentaminen, jolloin ensin sidotaan karboksyyliipään aminohappo, glysiini tai D-alaniini, tai niiden amidi, joissa pysyvä α -aminoryhmä on suojattu, tätä tarkoitusta varten tavanomaiseen synteettiseen kantajaan kovalenttisesti, α -aminon suojaryhmä lohkaistaan pois, näin saatuun vapaaseen aminoryhmään sidotaan lähinnä seuraava suojattu aminohappo sen karboksyyli-ryhmän kautta, sitten jälleen lohkaistaan tämän toisen aminohapon α -aminon suojaryhmä pois, tähän sidotaan seuraava aminohappo ja tällä tavoin askel askeleelta liitetään syntetisoitavan peptidin muut aminohapot oikeassa järjestyksessä, ja kun kaikki aminohapot on liitetty valmis peptidi lohkaistaan pois kantajasta ja mahdollisesti lohkaistaan pois lisäksi läsnä olevat sivuryhmien suojaryhmät.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että X on asetyyli- tai karbamoyyli-ryhmä, R^1 on D-Nal(2), D- tai L-Pro, D-Phe tai D-Phe(4-Cl), R^2 on D-Phe(4-Cl) tai D-Phe(4-F) ja R^3 on D-Trp tai D-Pal(3).

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että X on asetyyli, R^1 on D-Nal(2) tai D-Phe(4-Cl), R^2 on D-Phe(4-Cl), R^3 on D-Trp tai D-Pal(3) ja R^{10} on D-Ala.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että X on asetyyli.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että X on karbamoyyli.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^6 on D-Cit tai D-Hci.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en terapeutiskt användbar peptid med formeln

5



i vilken

10 X är en acylgrupp, som har erhållits från ogrenade eller grenade kedjor av alifatiska eller alicykliska karboxylsyror som innehåller 1 - 7 kolatomer, eller en karbamoylgrupp,

15 R^1 är D- eller L-Pro, D- eller L- Δ^3 -Pro, D-Phe, D-Phe(4-Hl), D-Ser, D-Thr, D-Ala, D-Nal(1) eller D-Nal(2),

R^2 är D-Phe eller D-Phe(4-Hl),

R^3 är D-Trp, D-Phe, D-Pal(3), D-Nal(1) eller D-Nal(2),

20 R^6 är D-Cit, D-Hci, D-Cit(Q) eller D-Hci(Q) och

R^{10} är Gly eller D-Ala,

varvid Hl är fluor, klor eller brom och Q är C_{1-3} -alkyl, eller för framställning av ett farmaceutiskt godtagbart syraadditionssalt därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att

25 motsvarande peptidfragment kondenseras med hjälp av i peptidkemi vanlig fragmentkondensation eller

peptiden bildas gradvis av utgångsaminosyror med hjälp av i peptidkemi vanlig fragmentkondensation eller

30 i peptiden med formeln I, i vilken R^6 är D-Orn eller D-Lys, förvandlas den fria aminogruppen av D-Orn eller D-Lys genom att bringa den att reagera med alkalicyanat eller med en förening som alstrar cyanat, eller med C_{1-3} -alkyl-isocyanat till en ureidogrupp och

35 de erhållna peptiderna acyleras eventuellt och/eller förvandlas till amider och

förvandlas eventuellt till fysiologiskt ofarliga syrasalt.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att ett gradvist bildande utförs,
5 varvid aminosyran i karboxyländan, glysin eller D-alanin,
eller en amid därav, i vilka den stabila α -aminogruppen
har skyddats, binds först kovalent på en för detta ända-
mål konventionell syntetisk bärare, skyddsgruppen i
10 α -amino-gruppen spjälks av, på den så erhållna fria ami-
nogruppen binds den närmast följande skyddade aminosyran
via dess karboxylgrupp, därefter spjälks skyddsgruppen i
 α -amino i denna andra aminosyra av, på denna binds den
närmast följande aminosyran och på detta sätt steg för
15 steg kopplas de övriga aminosyrorna i peptiden som skall
syntetiseras i rätt ordning, och när alla aminosyror har
kopplats, spjälks den färdiga peptiden från bäraren och
eventuellt spjälks även de närvarande skyddsgrupperna i
sidogrupperna av.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att X är en acetyl- eller karba-
moylgrupp, R^1 är D-Nal(2), D- eller L-Pro, D-Phe eller
D-Phe(4-Cl), R^2 är D-Phe(4-Cl) eller D-Phe(4-F) och R^3 är
D-Trp eller D-Pal(3).

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
25 k ä n n e t e c k n a t därav, att X är acetyl, R^1 är
D-Nal(2) eller D-Phe(4-Cl), R^2 är D-Phe(4-Cl), R^3 är
D-Trp eller D-Pal(3) och R^{10} är D-Ala.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4,
k ä n n e t e c k n a t därav, att X är acetyl.

30 6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4,
k ä n n e t e c k n a t därav, att X är karbamoyl.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6,
k ä n n e t e c k n a t därav, att R^6 är D-Cit eller
D-Hci.